

**Studien zur Pharmakokinetik fluorooptischer Sonden mit
unterschiedlichem Molekulargewicht**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Claudia Thomas
geboren am 07. Juni 1983 in Jena**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger** (Abteilung Experimentelle Radiologie, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie I Jena)
- 2. Prof. Dr. med. habil. Dietmar Gottschild** (im Ruhestand, ehemals Klinik für Nuklearmedizin Jena)
- 3. PD Dr. med. habil. Jens-Peter Heyne** (Abteilung Radiologie und Nuklearmedizin, Sophien- und Hufeland-Klinikum Weimar)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. Januar 2012

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idest <u>i</u> llata
ADCC	<u>a</u> ntibody <u>d</u> ependent <u>c</u> ellular <u>c</u> ytotoxicity
A. dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat (Summenformel $H_8N_2O_8S_2$)
AZ	<u>A</u> kten <u>z</u> eichen
BALB/c	laborgezüchtete <u>A</u> lbinomäuse, 1923 von Halsey J. <u>B</u> agg, Memorial Hospital New York, erworben
b. E.	<u>b</u> eliebige <u>E</u> inheiten
BF	<u>B</u> inning <u>F</u> actor
Bit	<u>b</u> inary digit (Maßeinheit für Datenmenge)
bonSAI	<u>b</u> io <u>o</u> ptical <u>N</u> IRF <u>S</u> mall <u>A</u> nimal <u>I</u> mager
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	<u>b</u> e <u>z</u> iehungs <u>w</u> eise
c	Formelzeichen für Stoffmengenkonzentration
CCD	<u>C</u> harge <u>C</u> oupled <u>D</u> evice
CEA	<u>C</u> arcino <u>e</u> mbrionales <u>A</u> ntigen
CLSM	<u>c</u> onfocal <u>l</u> aser <u>s</u> canning <u>m</u> icroscopy
CT	<u>C</u> omput <u>e</u> rtomographie
c_z	Formelzeichen für Zellkonzentration
d	Formelzeichen für Durchmesser
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidino-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium (standardisiertes Nährmedium für Zellkultur)
DMF	N,N- <u>D</u> imethylformamid
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>d</u> eoxyribonucleic acid
dt.	<u>d</u> eutsch
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
engl.	<u>e</u> nglisch
E_λ	Formelzeichen für Extinktion
ϵ_λ	Formelzeichen für molaren Extinktionskoeffizient
et al.	et alii (<i>dt.</i> und andere)
F(ab')	<u>f</u> ragment <u>a</u> ntigen <u>b</u> inding
$F(ab')_2$	bivalent <u>f</u> ragment <u>a</u> ntigen <u>b</u> inding
Fc	<u>f</u> ragment <u>c</u> rystalline
FMT	<u>F</u> luorescence <u>M</u> olecular <u>T</u> omography
FRI	<u>f</u> luorescence <u>r</u> eflectance <u>i</u> maging
F4/80	Makrophagen-Antigen
(m, μ)g	Einheitenzeichen für (Milli-, Mikro-)Gramm
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin (<i>engl.</i> <u>g</u> adolinium-diethylenetriamine penta-acetic acid)

Gd-DOTA	Meglumin-Gadoterat
h	Einheitenzeichen für Stunde(n)
HCl	Summenformel für Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HCO_3^-	Summenformel für Bikarbonation
HER2/neu	<u>human epidermal growth factor receptor 2</u>
H_2O	Summenformel für Wasser
ICAM-1	<u>intercellular adhesion molecule 1</u>
ICG	<u>Indocyaningrün</u>
IDIR	<u>Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie</u> Jena
I_F	Formelzeichen für Fluoreszenzintensität
IgG	<u>Immunglobulin G</u>
I:P-Verhältnis	<u>Interstitium:Plasma-Ratio</u>
I_0	Formelzeichen für Intensität von Anregungslicht
i. v.	<u>intravenös</u>
KCl	Summenformel für Kaliumchlorid
kDa	<u>Kilodalton</u>
KH_2PO_4	Summenformel für Kaliumdihydrogenphosphat
(m, μ)l	Einheitenzeichen für (Milli-, Mikro-)Liter
lat.	<u>lateinisch</u>
(n)m	Einheitenzeichen für (Nano-)Meter
(m)M	Einheitenzeichen für (milli-)molar
MEM	<u>Minimum Essential Medium</u>
Mg	Symbol für Magnesium
min	Einheitenzeichen für Minute(n)
mol/l	Einheitenzeichen für Mol (pro Liter)
MRT	<u>Magnetresonanztomographie</u>
NaN_3	Summenformel für Natriumazid
NaCl	Summenformel für Natriumchlorid
NAD	<u>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid</u> (Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$)
NADH	reduzierte Form des <u>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotids</u> (Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$)
Na_2HPO_4	Summenformel für Natriumphosphat
NaOH	Summenformel für Natriumhydroxid
NHS-Ester	<u>N-Hydroxisuccinimid-Ester</u>
NIR(F)	<u>Nahinfrarot(-Fluoreszenz)</u>
NMRI	<u>Naval Medical Research Institute</u>
(n, μ)m	Einheitenzeichen für (Nano-, Mikro-) Meter
PBS	<u>phosphate buffered saline</u>
TFT	<u>thin film transistor</u>
PET	<u>Positronen-Emissions-Tomographie</u>

pH	<u>p</u> ondus <u>H</u> ydrogenii oder <u>p</u> otentia <u>H</u> ydrogenii (<i>lat.</i> pondus = Gewicht; <i>lat.</i> potentia = Kraft; <i>lat.</i> hydrogenium = Wasserstoff)
p. i.	<u>p</u> ost <u>i</u> njectionem
ROI	<u>r</u> egion <u>o</u> f <u>i</u> nterest
rpm	<u>r</u> ounds per <u>m</u> inute
SCID	<i>engl.</i> <u>s</u> evere <u>c</u> ombined <u>i</u> mmunodeficiency
scFv	<u>s</u> ingle- <u>c</u> hain <u>v</u> ariable <u>f</u> ragment
SNR	<u>s</u> ignal-to-noise- <u>r</u> atio
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SDS-PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> odecylsulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
sec	Einheitenzeichen für Sekunde(n) (vom <i>engl.</i> second[s])
SPECT	<u>S</u> ingle <u>P</u> hoton <u>E</u> mission <u>C</u> omputed <u>T</u> omography
TEMED	<u>N,N,N',N'</u> - <u>T</u> etramethylethan-1,2- <u>d</u> iamin
TM	<u>t</u> rademark (<i>dt.</i> Handelsmarke)
Tris-Base	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Formelzeichen $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)
Tris/HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-hydrochlorid (Formelzeichen $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{ClH}$)
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	Formelzeichen für Volumen
(v/v)	<u>v</u> olume to <u>v</u> olume (<i>dt.</i> Volumen zu Volumen)
W	Einheitenzeichen für Watt
(w/v)	<u>w</u> eight to <u>v</u> olume (<i>dt.</i> Gewicht zu Volumen)
ϵ_λ	Formelzeichen für den molaren Extinktionskoeffizienten
Φ	Formelzeichen für Quantenausbeute
μ	Einheitenzeichen für Mikro-, mikro-
%	Einheitenzeichen für Prozent
°C	Einheitenzeichen für Grad Celsius
x g	multipliziert mit Fallbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungssverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Molekulare Bildgebung mit fluorooptischen Sonden	3
2.1.1 Molekulare Bildgebung vs. Klassische Bildgebung	3
2.1.2 Wissenschaftliche Grundlagen der Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung	3
2.1.3 Die Rolle der Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung in der molekularen Bildgebung	6
2.1.4 Fluorooptische Sonden zur Darstellung molekularer Prozesse	7
2.1.4.1 Cyaninfarbstoffe als signalgebendes Modul fluorooptischer Sonden	8
2.1.4.2 Antikörper als Bindungsmodule fluorooptischer Sonden	10
2.2 Bedeutung pharmakokinetischer Betrachtungen für die molekulare Bildgebung	11
2.3 Fluorooptische Antikörper- und Antikörperfragmentsonden mit unterschiedlichem Molekulargewicht	12
2.3.1 Modulationen des Molekulargewichts von Antikörpern	12
2.3.2 Auswirkungen und pharmakokinetische Effekte der Modulation des Molekulargewichts von Antikörpern	12
3 Ziele der Arbeit	14
4 Material und Methoden	15
4.1 Geräte und Materialien	15
4.1.1 Geräte	15
4.1.2 Materialien	15
4.1.3 Chemikalien	17
4.1.4 Immunglobuline	18
4.1.5 Zelllinien	18
4.1.6 Zellkulturmedien	19
4.2 Der Nahinfrarotfarbstoff Dy-676	19
4.2.1 Ermittlung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Dy-676-Farbstoffs	20
4.3 Synthetisierung und biochemische Charakterisierung fluorooptischer Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden	21
4.3.1 Herstellung und Aufreinigung von F(ab')	21
4.3.2 Herstellung und Aufreinigung von F(ab') ₂	22
4.3.3 Pufferaustausch mit <i>iCON™ Concentrators</i>	23
4.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	24
4.3.5 Konzentrierung von Proteinproben	25
4.3.6 Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamide-Gel-Elektrophoresis (SDS-PAGE)	25
4.3.7 Fluorochrome Kopplung von Antikörpern und Antikörperfragmenten	27

4.3.8	Bestimmung der Farbstoff-Protein-Verhältnisse fluorooptischer Sonden	28
4.3.9	Untersuchungen zur Quantenausbeute von F(ab')-Dy	29
4.4	Das Bildgebungsinstrument <i>bonSAI@</i>	29
4.5	<i>In vitro</i> -Versuche	31
4.5.1	Kultivierung von Zelllinien	31
4.5.1.1	LS-174T-Zellen	31
4.5.1.2	A-375-Zellen	31
4.5.1.3	Zellkultivierung	31
4.5.1.4	Bestimmung der Zellzahl	32
4.5.1.5	Kryokonservierung	33
4.5.1.6	Auftauen von Zellen	33
4.5.2	Fluorooptische Messungen	33
4.5.3	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	34
4.6	<i>In vivo</i> -Versuche	35
4.6.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	35
4.6.1.1	NMRI-Mäuse	36
4.6.1.2	BALB/c/SCID-Mäuse	36
4.6.2	Implantation von Tumoren	36
4.6.3	Untersuchung der Biodistribution fluorchrom-markierter F(ab')-Fragmente an xenotransplantierten Mäusen	37
4.6.4	Untersuchung der Biodistribution von Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden an gesunden Mäusen	37
4.6.4.1	Blutkinetische Untersuchungen	37
4.6.4.2	Untersuchungen zur Organdistribution	38
4.7	<i>ex vivo</i> -Versuche	39
4.7.1	Aufbereitung von Blutproben	39
4.7.2	Organ- und Gewebepräparation	39
4.7.3	Fluorooptische Messungen	39
4.8	Darstellung des Datenmaterials, mathematische Berechnungen und statistische Analyse	40
5	Ergebnisse	42
5.1	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Dy-676-Konzentration	42
5.2	Fluorooptische Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden	43
5.2.1	Antikörperspaltung und Charakteristika der Antikörperfragmente	43
5.2.2	Fluorchromgekoppelte Antikörper und Antikörperfragmente	45
5.2.3	Quantenausbeute des F(ab')-Dy	47
5.3	Wechselwirkungen der F(ab')-Dy-Sonde mit ausgewählten Tumorzellen	47
5.3.1	Fluorooptische Analyse	47
5.3.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	49
5.4	Kinetik fluorchrom-markierter, unspezifischer F(ab')-Fragmente in ausgewählten Tumoren	50
5.5	Biodistribution fluorchrommarkierter, unspezifischer F(ab')-Fragmente in xenotransplantierten BALB/c/SCID-Mäusen	53
5.6	Pharmakokinetik fluorooptischer Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden	54

5.6.1	Blutkinetik	54
5.6.2	Organdistribution	59
5.6.2.1	Autofluoreszenzen der Organe	60
5.6.2.2	IgG-Dy	61
5.6.2.3	F(ab') ₂ -Dy	64
5.6.2.4	F(ab')-Dy	68
5.6.2.5	Vergleich der fluorooptischen Sonden untereinander	72
6	Diskussion	84
6.1	Die neuen kleinmolekularen fluorooptischen Sonden	84
6.2	<i>In vitro</i> -, <i>in vivo</i> - und <i>ex vivo</i> -Versuche zum Carcinoembryonalen Antigen	87
6.3	Pharmakokinetische <i>ex vivo</i> -Untersuchungen	90
6.3.1	Blutuntersuchungen	90
6.3.2	Organuntersuchungen	92
7	Schlussfolgerung und Ausblick	96
	Literaturverzeichnis	VII
	Anhang	XV

1 Zusammenfassung

Im Zuge der immer detaillierteren Erforschung molekularer Prozesse verschiedenster Krankheitsgeschehen wird auch das Interesse an einer bildgebenden *in vivo*-Darstellung dieser Abläufe stetig größer. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Molekularen Bildgebung mit Hilfe fluorooptischer Techniken, die sogenannte Nahinfrarot-Bildgebung, stellt hier ein aussichtsreiches, schnelles, hochsensitives und vor allem kostengünstiges Verfahren dar. Zahlreiche Untersuchungen speziell zu fluorooptischen *Antikörpersonden* haben zum einen gezeigt, dass die *in vivo*-Darstellung molekularer Ziele mit dieser Methode sinnvoll und anwendbar ist, zum anderen jedoch, dass die Immunglobulin-Sonden aufgrund ihres großen Molekulargewichts (150 kDa) eine sehr träge Kinetik besitzen, schlecht in Gewebe eindringen und somit ein ausgeprägtes, störendes Hintergrundsignal generieren. Zudem haben intakte Antikörper, wie bereits aus der therapeutischen Anwendung bekannt, den Nachteil, mit Hilfe des Fc-Fragments Immunprozesse in Gang setzen und somit schwere Nebenwirkungen auslösen zu können. Es besteht daher ein großes Interesse darin herauszufinden, ob die Reduktion des Molekulargewichts der Immunglobulin-Sonden durch Abspaltung des Fc-Fragments eine Verbesserung der Pharmakokinetik solcher fluorooptischer Sonden bewirken kann. Gleichzeitig besteht hierbei die Intention, mögliche Immunreaktionen des Organismus auf die Sonden zu vermindern.

In dieser Arbeit wurde die Reduktion des Molekulargewichts durch Spaltung von Maus- γ -Globulin mittels Papain und Pepsin zur Herstellung von antigen~~unspezifischen~~ $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Fragmenten realisiert. Die Antikörperfragmente wurden - wie ihr „Muttermolekül“ IgG - an den Hemicyaninfarbstoff Dy-676 gekoppelt. $F(ab')$ -Dy wurde *in vitro* an LS174T- und A375-Zellen sowie *in vivo* und *ex vivo* an den gleichen Tumormodellen in *BALB/c/SCID*-Mäusen auf Antigenunspezifität getestet. Daraufhin wurden mit den drei hergestellten Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Dy Zeitreihenuntersuchungen der Verteilung im Blut sowie in den Organen Muskel, Herz, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Nieren und Milz nach i.v.-Injektion in gesunde *NMRI*-Mäuse durchgeführt.

In Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich erkennen, dass die IgG-Dy-Sonde wie zu erwarten eine sehr komplexe und träge Kinetik besaß, die von verschiedenen Interaktionen mit den Körpergeweben, wie beispielsweise mit Gewebsmakrophagen oder Leberparenchymzellen, abhängig zu sein scheint. $F(ab')_2$ -Dy hingegen zeigte eine optimierte Kinetik, da es sich schnell in den Geweben verteilte, rasch wieder eliminiert wurde und keine die Pharmakokinetik beeinflussenden Interaktionen mit den Geweben einging. Zudem erwies sich die Sonde als hauptsächlich renal eliminiert - ein typisches Merkmal von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht. Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik des $F(ab')$ -Dy führten interessanterweise zu gegensätzlichen Ergebnissen. Trotz schnellen An- und Abflutens der Sonde im Blut zeigte sich eine weitaus langsamere Kinetik in den Organen als für die $F(ab')_2$ -Dy-Sonde sowie eine starke Anreicherung in der Leber, was auf einen hepatischen Abbau hinweist. Dies steht zum einen entgegen dem biologischen Gesetz, dass die Rate des renalen Abbaus mit Abnahme des Molekulargewichts von Proteinen steigt und zum anderen entgegen den Erkenntnissen zu nuklearen $F(ab')$ -Sonden. Es ist hier anzunehmen, dass der Dy-Farbstoff selbst, anders als bei Verwendung der $F(ab')_2$ -Sonde, einen enormen Einfluss auf die Pharmakokinetik der $F(ab')$ -Sonde nimmt, denn die in dieser Arbeit gewonnenen pharmakokinetischen Daten sind vereinbar mit in der Literatur bereits bekannten Daten zum Dy-676.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass es möglich ist, eine Optimierung der Pharmakokinetik fluorooptischer Antikörpersonden durch Reduk-

tion des Molekulargewichts zu erlangen. Dabei erwies sich die $F(ab')_2$ -Sonde im Vergleich zu IgG- und $F(ab')$ -Dy als zu favorisierende Sonde. Es ist vorstellbar, dass $F(ab')_2$ -Dy als „Grundgerüst“ für eine Menge antigenspezifischer fluorooptischer Sonden zur molekularen Darstellung verschiedenster Erkrankungen genutzt werden kann.

2 Einleitung

2.1 Molekulare Bildgebung mit fluorooptischen Sonden

2.1.1 Molekulare Bildgebung vs. Klassische Bildgebung

Mit der Entdeckung immer neuerer molekularer Zusammenhänge und dem Eingang immer detaillierterer Krankheitsursachenzuschreibungen auf biochemischer und genetischer Ebene in die moderne Medizin wird auch der Drang nach einer bildgebenden *in vivo*-Darstellung dieser Prozesse immer größer. An diesem Punkt kommt die molekulare Bildgebung zum Einsatz. Sie benutzt Moleküle oder generiert Signale von Molekülen, um Struktur und Funktion molekularer Systeme wie Proteine, zelluläre Kompartimente, Zellen, Organsysteme oder auch einen ganzen Organismus darzustellen (Weissleder und Mahmood 2001, Kim 2003).

Klassische Bildgebungsverfahren wie Röntgen, klassische Computer- und Magnetresonanztomographie zeigen lediglich anatomische oder seit neuerem auch physiologische Veränderungen auf. Dies sind jedoch späte Manifestationen von molekularen Veränderungen, auf denen sich Erkrankungen begründen (Weissleder und Mahmood 2001). Der höchst interessante Vorteil molekularer Bildgebungsmethoden liegt deshalb in der Möglichkeit, molekulare Abnormitäten, auf deren Grundlage Krankheit entsteht, sichtbar zu machen (siehe Abbildung 1) - ein Paradigmenwechsel in der Radiologie (Massoud und Gambhir 2003).

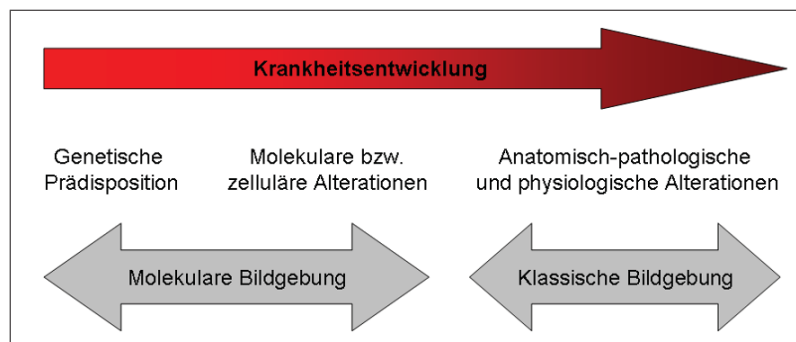


Abbildung 1: Potenzial Molekularer Bildgebung im Vergleich zur Konventionellen Bildgebung. Modifiziert nach Grimm und Wunder (Grimm und Wunder 2005).

Es liegt im Bestreben der Forschung, durch die Verknüpfung der molekularen mit den anatomischen Informationen der Konventionellen Bildgebung frühere Diagnosen, detailliertere Klassifikationsmöglichkeiten von Erkrankungen sowie neue Möglichkeiten der Prognostizierung von Folgeerscheinungen zu gewinnen. Weiterhin sollen neue Wege der Therapieentwicklung und eine gute Überwachbarkeit des Behandlungserfolges erreicht werden (Grimm und Wunder 2005). Denkt man beispielsweise an die Gruppe der Krebserkrankungen, deren Inzidenz stetig steigt und deren weltweite Mortalität laut WHO von 7,9 Millionen im Jahre 2007 auf 12 Millionen Todesfälle im Jahre 2030 ansteigen soll (WHO 2009), so sind diese Ziele enorm attraktiv. Ein frühes Erkennen kann die Chance auf Heilung und höhere Lebensqualität bedeuten.

2.1.2 Wissenschaftliche Grundlagen der Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung

Eine faszinierende Möglichkeit, wichtige molekulare Informationen zu gewinnen, stellt die nichtinvasive *in vivo*-Bildgebung mit optischen Methoden dar. Vor allem die Methode der Nahinfrarot-Fluores-

zenz(NIRF)-Bildgebung beweist sich bisher als sehr aussichtsreich. Sie nutzt biochemische Marker, die an fluorochrome Farbstoffe gebunden sind, zur Darstellung molekularer Ziele und Prozesse (siehe Abbildung 2) (Weissleder und Mahmood 2001).

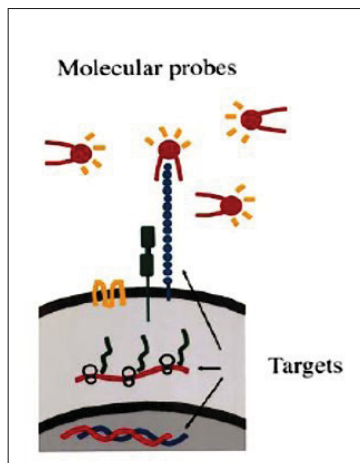


Abbildung 2: Voraussetzungen für die optische molekulare *in vivo*-Bildgebung. Fluorochromgekoppelte molekulare Sonden (*engl.* molecular probes) binden an spezielle Zielstrukturen (*engl.* targets) (Weissleder und Mahmood 2001).

Diese fluorochromgekoppelten bzw. fluorooptischen Sonden können nach Anregung durch Strahlung höherer Energie und kürzerer Wellenlängen (sichtbares Licht, UV-Licht) spontan Photonen emittieren. Dem Prozess liegt ein bekanntes physikalisches Prinzip zugrunde (siehe Abbildung 3): Wird einem Molekül Energie als elektromagnetische Strahlung zugeführt, so wird diese Energie transformiert, d. h. umgewandelt. Der Grund hierfür ist, dass sich die Elektronen des Moleküls bei hohem Energiegehalt der Anregungsstrahlung aus ihren Orbitalen (zu 90 % wahrscheinlicher Aufenthaltsraum eines Elektrons) lösen und in leere, unbesetzte Orbitale höheren Energiegehalts angehoben werden. Dieser angeregte Zustand ist energetisch ungünstig und somit instabil. Nach 10^{-9} bis 10^{-6} sec fällt das Elektron wieder in sein ursprüngliches Orbital zurück und Energie wird wiederum abgegeben. Meist geschieht dies in Form von Schwingung (Wärmeabgabe), man nennt diesen Prozess auch „strahlungslose Desaktivierung“ oder „internal conversion“ (*dt.* innere Umwandlung). Fluorochrome jedoch können aufgrund ihrer besonderen Struktur die aufgenommene Energie schlecht in Schwingung transformieren und geben stattdessen Photonen bzw. elektromagnetische Strahlung ab. Diese sogenannte spontane Emission stellt das Prinzip der Fluoreszenz dar und erfolgt laut der Kasha-Regel stets vom angeregten Zustand mit der geringsten Energie (S1-Zustand) aus (Halliday et al. 2003, Weiß 2010).

Die so emittierte elektromagnetische Strahlung liegt meist im sichtbaren Bereich des Spektrums, man nennt sie Fluoreszenzlicht. Sie ist generell etwa 20 bis 50 nm langwelliger als das Anregungslicht („Stokes shift“), weil zumindest ein Teil der Energie immer in Wärmeenergie transformiert wird (Halliday et al. 2003). Da das emittierte längerwellige Licht sowohl vom absorbierten als auch gestreuten kürzerwelligen Licht durch optische Filtersysteme abgrenzbar ist, besitzt die Detektion der Fluoreszenz eine sehr hohe Sensitivität. Breite Anwendung findet die Fluoreszenzdetektion bereits in der *in vitro*-Darstellung zellulärer und subzellulärer Komponenten mittels konfokaler Mikroskopie (Korlach et al. 1999) oder Multiphotonen- und intravitaler Mikroskopie (König 2000). Somit scheint auch die *in vivo*-Bildgebung unter Nutzung dieses Prinzips zukunftssträftig.

Die NIRF-Bildgebung nutzt Nahinfrarot-Laserlicht (650 bis 900 nm), das im elektromagnetischen Spektrum am Übergang zwischen dem Bereich des sichtbaren Lichts (380 bis 780 nm) und des Infrarotlichts (780 nm bis 1 mm) liegt, als Anregungsstrahlung. Die in den Geweben auftretende Lichtabsorption, die vor allem von Häm- und Myoglobingehalt, d. h. von Durchblutung und Muskel-

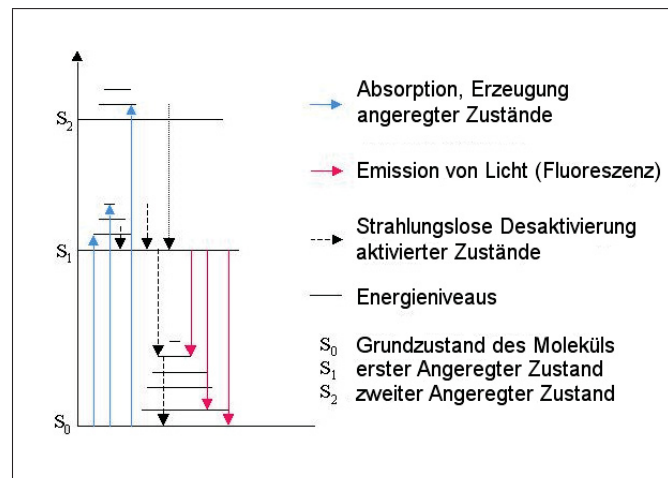


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm. Vereinfachte Darstellung des Energieniveauschemas eines Elektrons. Das Diagramm zeigt verschiedene Möglichkeiten des Elektrons, Energie nach Photonenabsorption wieder abzugeben. Meist kommt es zur strahlungslosen Desaktivierung des aktivierten Zustandes (Wärmeabgabe). Beim Übergang zwischen den elektronischen S_1 - und S_0 -Energiezuständen kann eine Photonenemission erfolgen, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Weiß 2010).

fasergehalt, abhängig, ist in diesem Bereich am niedrigsten. Man nennt diesen Wellenlängenbereich auch „diagnostisches Fenster“ (siehe Abbildung 4) (Weissleder 2001).

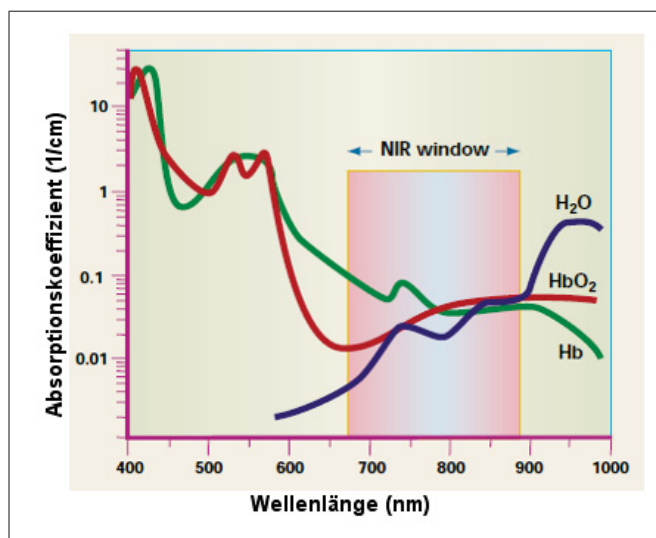


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Absorptionsspektren von Wasser (H₂O), oxygeniertem Hämoglobin (HbO₂) und Desoxyhämoglobin (Hb) sowie des diagnostischen Fensters (engl. NIR window) (Weissleder und Mahmood 2001). Achsenbeschriftungen eigenhändig.

Die Nutzung all dieser Vorteile der Fluoreszenz im Nahinfrarotbereich für die *in vivo*-Bildgebung molekularer Prozesse folgt nun einem einfachen Prinzip: Nach Injektion einer fluorooptischen Sonde in ein Versuchstier wird diese durch Beleuchtung mit NIR-Laserlicht angeregt. Das emittierte Licht, welches ebenfalls im Nahinfrarotbereich liegt, kann mit Hilfe einer Charge-Coupled-Device(CCD)-Kamera detektiert werden. Entscheidend hierbei ist Vorschaltung eines Interferenzfilters, welcher lediglich vom emittierten Fluoreszenzlicht mit spezieller Wellenlänge durchdrungen werden kann. Dies ist notwendig, da elektromagnetische Wellen beim Durchgang durch Materie an den einzelnen Teilchen gestreut werden, insoweit der Durchmesser der Teilchen kleiner als die Wellenlänge des Lichts ist. Als Beispiel soll hier das Wassermolekül als dominantes Molekül im menschlichen Körper dienen. Es besitzt eine Größe von etwa 0,2 - 0,3 nm (Adam et al. 2009), nur ein winziger Bruchteil der Wellenlänge des Nahinfrarotlichts (650 bis 900 nm). Die somit beim Durchtritt durch den wasserreichen Organismus entstehende sogenannte Rayleigh-Lichtstreuung erfolgt in rein zufällige Richtung, d. h.

elastisch (Lipson et al. 1997, Hecht 2001). Sie ist deshalb nicht berechenbar und muss mit Hilfe des Interferenzfilters aus dem detektierten Licht herausgefiltert werden.

Ein bekanntes Bildgebungssystem, das mit der zuvor beschriebenen Methodik arbeitet, ist das sogenannte fluorescence reflectance imaging (FRI)-System (*engl.* Fluoreszenz-Reflexions-Bildgebungssystem, siehe Abbildung 5). Es zeigte sich bereits in der Detektion von Enzymaktivitäten wie Kathepsin D (Tung et al. 1999) und Matrix-Metalloproteinase-2 (Bremer et al. 2001) erfolgversprechend.

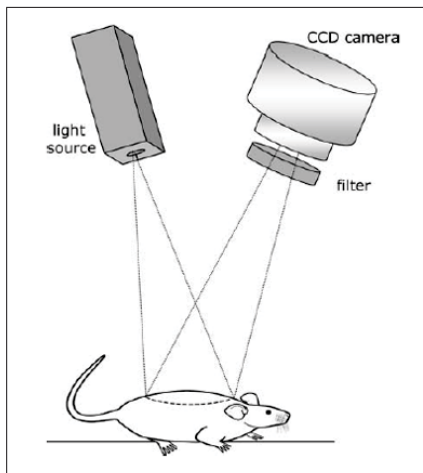


Abbildung 5: Darstellung des Prinzips eines fluorescence reflectance imaging-Systems (*dt.* Fluoreszenz-Reflexions-Bildgebungssystem). Beleuchtung des Versuchstieres durch eine Lichtquelle (*engl.* light source) mit definierter Wellenlänge im NIR-Bereich. Spontane Emission von Licht durch vorher injizierte fluorooptische Sonde. Aufnahme eines Bildes durch CCD-Kamera unter Zwischenschaltung eines längerwelligen Interferenzfilters (Ntziachristos et al. 2003).

Zu beachten ist bei Nutzung dieser Methode, dass in allen Geweben von Natur aus niedrige Mengen an Fluorophoren vorkommen, d. h. funktionelle Molekülgruppen, die Fluoreszenz bewirken. Beispiele hierfür sind Nikotinamide (NAD(H)), Kollagen, Elastin und Protoporphyrine (Bornhop et al. 2001, Wagnières et al. 1998). Sie bewirken die sogenannte „Autofluoreszenz“ und speziell in stoffwechselaktiven Geweben wie Tumoren steigt ihre Konzentration. In der NIR-Region ist diese Autofluoreszenz jedoch minimal und die Zielregion lässt sich somit deutlich vom unerwünschten Hintergrundrauschen abgrenzen. Man erhält gute signal-to-noise-ratios (*dt.* Signal-Rausch-Verhältnisse, Abkürzung SNR). Der NIR-Laser kann abhängig vom jeweiligen Gewebetyp eine Tiefenpenetration von 7 bis 14 cm erreichen. Beispielsweise kann Brustgewebe im Vergleich zu Muskelgewebe sehr gut durchdrungen werden. Auch die Wellenlänge spielt hier eine Rolle: die beste Tiefenpenetration erlangt man bei etwa 650 bis 750 nm und um 800 nm (Ntziachristos et al. 2002a, Weissleder und Ntziachristos 2003).

2.1.3 Die Rolle der Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung in der molekularen Bildgebung

Die Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung stellt eine essentielle Säule der molekularen Bildgebung dar. Sie eignet sich aufgrund eingeschränkter Gewebedurchdringtiefen vor allem zur Darstellung oberflächennaher Prozesse wie z. B. im Bereich der Brust (Ntziachristos und Chance 2001). Es zeigen sich jedoch auch weitere Anwendungsmöglichkeiten wie die Darstellung von kardialen Blutfluss und Perfusion während kardiochirurgischer Eingriffe (Nakayama et al. 2002) oder die endoskopische Abbildung von Proteaseaktivitäten in Kolonadenomen (Funovics et al. 2003). Somit bietet sich die außerordentlich interessante Möglichkeit, direkt intraoperativ oder während eines diagnostischen Eingriffs Informationen über biochemische Eigenschaften des untersuchten Gewebes zu erhalten.

Die NIRF-Bildgebung benötigt lediglich sehr geringe Kontrastmittelkonzentrationen im nano- bis femtomolaren Bereich. Im Vergleich dazu müssen bei der Detektion molekularer Ziele mittels nuklearmedizinischer Verfahren mikro- bis pikomolare, mittels Magnetresonanztomographie (MRT) milli- bis mikromolare und mittels Computertomographie (CT) sogar mindestens millimolare Konzentrationen

eingesetzt werden (Grimm und Wunder 2005).

Die mit der höchst sensitiven NIRF-Bildgebung einzig vergleichbar empfindlichen Verfahren sind Single Photon Emission Computed Tomography (*dt.* Einzelphotonen-Emissions-Tomografie, Abkürzung SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET), bei denen Radionuklide im Rahmen des Tracerprinzips verwendet werden (Massoud und Gambhir 2003). Die Vorteile gegenüber diesen molekularen Bildgebungsarten gehen vor allem mit dem Verzicht auf radioaktive Substanzen einher. Fehlende Strahlenbelastung, die auch als Vorteil gegenüber der CT genannt werden kann, sowie einfache Handhabung und Herstellung der Sonden erleichtern den täglichen Umgang mit dem diagnostischen Mittel der Fluoreszenz-Bildgebung. Es erfolgt bei abgedunkelter Lagerung kein Intensitätsverlust der Kontrastmittel über die Zeit und die Sondenherstellung mittels Fluoreszenzmarkierung kann schnell und kostengünstig erfolgen. Im Gegensatz dazu ist vor allem das PET sehr aufwändig und teuer, denn hier werden Nuklide mit kurzer Halbwertszeit eingesetzt, um die Strahlenbelastung zu reduzieren. Das bedeutet, dass die Isotope im Zyklotron vor Ort generiert werden müssen und eine rasche Synthese des Radiopharmakons nötig ist (Hnatowich 2002).

Aufgrund eines Tiefenlimits von wenigen Zentimetern besitzt das planare fluorescece reflectance imaging-Verfahren Nachteile gegenüber tomografischen Verfahren wie CT, MRT, SPECT und PET. Auch kann mit der CT, die ein Schnittbildröntgenverfahren zur Erzeugung transversaler Schichten darstellt, sowie der MRT, welche Schnittbilder in frei wählbarer Raumebene durch Magnetisierung von Atomkernen mit ungerader Protonenzahl erzeugt, eine bessere räumliche Auflösung erreicht werden (Massoud und Gambhir 2003). Die NIRF-Bilgebung dagegen ist mit planaren Methoden auf 1 mm beschränkt und liefert somit nur unzureichende Informationen auf anatomisch-morphologischer Ebene. Der Grund hierfür ist, dass sich überlagernde Signale aus vielen Zellschichten in einem Bild zusammengefasst werden. Somit ist eine quantitative Bestimmung von Fluoreszenzkonzentration und Größe des fluoreszierenden Bereichs nicht möglich. Neuere Entwicklungen wie die Fluorescence Molecular Tomography (FMT) erreichen jedoch durch Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses eine Auflösung im Submillimeterbereich. Es können volumetrische Messungen durchgeführt werden, die Eindringtiefe wird gesteigert und eine Quantifizierung der Fluoreszenzstärke wird möglich (Ntziachristos et al. 2002b). Auch die Kombination mit CT oder MRT, um einen Informationszugewinn auf anatomisch-morphologischer Ebene zu erreichen, scheint eine ausgezeichnete Option (Bremer et al. 2003, Ale et al. 2009).

Eine überaus interessante Möglichkeit der NIRF-Bildgebung stellt auch das multi-channel imaging (*dt.* Mehr-Kanal-Bildgebung) dar, welches unter Einsatz multimodaler Kontrastmittel mit verschiedenen Emissionswellenlängen ein zeitgleiches Untersuchen verschiedener biologischer Prozesse ermöglicht (Weissleder und Ntziachristos 2003). Auch ist die Autofluoreszenz der Gewebe in den meisten Körpergebieten sehr niedrig, weshalb sogar bei Vorhandensein weniger Fluorochrome in der Zielregion kaum Störsignale entstehen (siehe 2.1.2). Im Gegensatz dazu ist beispielsweise der Protonengehalt in allen Körperregionen sehr hoch, was zu einer schlechten SNR in der MRT führen kann (Bremer et al. 2003).

2.1.4 Fluorooptische Sonden zur Darstellung molekularer Prozesse

Ein bedeutendes Ziel in der Weiterentwicklung optischer *in vivo*-Bildgebungsverfahren ist die Konstruktion neuer fluorooptischer Sonden. Man nutzt dabei verschiedene Möglichkeiten (siehe Abbildung 6). Unspezifische fluorooptische Sonden bestehen nur aus dem signalgebenden Modul, dem

Fluorochrom, welches durch Kopplung an verschiedene andere Substanzen moduliert werden kann. Sie werden zur Detektion von Permeabilitäts- und Perfusionsunterschieden der Gewebe eingesetzt (Grimm und Wunder 2005).

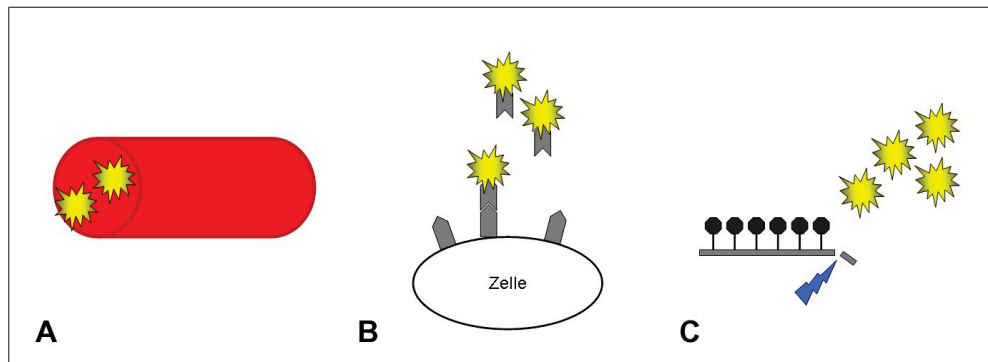


Abbildung 6: Aufbau verschiedener molekularer Sonden. (A) Unspezifische Sonden zur Perfusions- und Permeabilitätsdetektion, (B) spezifische Sonden zur Darstellung von Zielmolekülen und (C) aktivierbare zielgerichtete Sonden, die erst nach Interaktion mit dem Zielmolekül (Blitz) detektierbar sind. Modifiziert nach Grimm und Wunder (Grimm und Wunder 2005).

Spezifische Sonden (*engl.* „targeted probes“) binden über spezifische, fluorochromgekoppelte Liganden an eine Ankerstruktur, das Zielmolekül. Dies können Nukleinsäuresequenzen, Proteine, Kohlenhydrate oder auch Lipide sein. Somit zeigen spezifischen Sonden Lokalisation und Verteilung von Molekülen und Zellarten auf. Je mehr Kopien dieser Zielstrukturen pro Zelle vorhanden sind, desto geeigneter sind sie. Als Bindungsmodul oder Ligand kommen kleinere Moleküle wie Rezeptor-Liganden oder Enzymsubstrate oder auch größere Moleküle wie rekombinante Proteine oder Antikörper in Frage (Bremer et al. 2003, Grimm und Wunder 2005). Wichtig dabei ist, dass Ligand und Ankerstruktur nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip aneinander binden.

Eine dritte Möglichkeit besteht in der Herstellung aktivierbare Sonden (*engl.* „smart sensor probes“). Dies sind zielgerichtete Sonden, die mit dem Zielmolekül interagieren müssen, um detektierbar zu werden. Das unerwünschte Hintergrundsignal kann somit verringert werden (Weissleder et al. 1999).

2.1.4.1 Cyaninfarbstoffe als signalgebendes Modul fluorooptischer Sonden

Bevorzugte Anwendung als signalgebendes Modul fluorooptischer Sonden finden die Derivate des Indocyaningrüns. ICG ist ein in der Klinik oftmals eingesetzter Farbstoff für Leberfunktionsmessungen in der Intensivmedizin, ophthalmologische Fluoreszenzangiographie (Hayashi et al. 1986), Perfusions- und Funktionsdiagnostik verschiedener Organe bzw. Gewebe sowie kardiophysiologische Messungen (Schad et al. 1977). Emission und Extinktion des Farbstoffs und seiner Derivate liegen idealerweise im NIR-Bereich.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist eine wichtige Größe zur Quantifizierung der Qualität von Fluorochromen. Wird für jedes absorbierte Photon auch 1 Photon emittiert, ist die Quantenausbeute $\Phi = 1$ (100 %). Allerdings kann das Optimum nur von wenigen Molekülen annähernd erreicht werden. Die Derivate des Indocyaningrüns haben nicht nur eine höhere Quantenausbeute als das ICG selbst, sondern besitzen auch höhere Extinktionskoeffizienten und somit ein größeres Lichtabsorptionsvermögen (Bornhop et al. 2001, Ballou et al. 1997).

Unerwünscht im Zusammenhang mit Fluorochromen ist das bisher noch recht wenig verstandene Phänomen der Fotobleich-Reaktion (*engl.* photobleaching). Aufgrund lichtinduzierter Schädigung

bzw. kovalenter Modifikation (kovalente Bindung mit Umgebungsmolekülen) sind Fluorochrome nicht fotostabil und verlieren die Fähigkeit zu fluoreszieren. Der in der Forschung häufig eingesetzte Cyaninfarbstoff Cy5 erleidet z. B. einen Verlust von 25 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität nach etwa 30 sec Beleuchtung mit 100 W-Quecksilberbogenlampe (Berlier et al. 2003). Die Lagerung der Farbstoffe im Dunkeln ist deshalb essentiell.

Das sogenannte „photosensitizing“ (dt. Fotosensibilisierung) betrifft Stoffe, die pharmakologisch inaktiv sind, aber durch UV- und Sonnenlicht in aktive Metabolite umgewandelt werden. Sie können mit verschiedenen Zellkomponenten wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren direkt oder durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies interagieren. Die somit entstehenden strukturellen Modifikationen zellulärer Komponenten führen zu Zellschäden (Kim 2003). Derartige Eigenschaften sind für die ICG-Derivate nicht wünschenswert und wurden bisher auch nicht beschrieben.

Fluorochrome Farbstoffmoleküle können durch ihre Umgebung, d. h. andere fluorochrome Farbstoffmoleküle, Lösungsmittel und eventuelle weitere Bestandteile beeinflusst werden. Diesen Vorgang nennt man Quenching (engl. Löschung). Er kann dynamisch (stoßbedingt) oder statisch, das bedeutet durch Bildung eines Komplexes zwischen Farbstoffmolekül und Quencher, ablaufen und führt zu Verkürzung von Lebensdauer sowie Minderung der Fluoreszenzintensität des Fluorochroms (Willert 1995). Häufig sind die Farbstoffmoleküle selbst Quencher und löschen sich gegenseitig aus. Gruber et al. konnten z. B. zeigen, dass der proteingebundene Cy5-Farbstoff stabile Dimere mit „sich selbst“, d. h. mit weiteren proteingebundenen Cy5-Molekülen, bildet. Dies führt zu starkem Energietransfer und demzufolge zu ausgeprägtem Fluoreszenzquenching. Der Vorgang wird umso mehr gefördert, je mehr Cy5-Moleküle an das Bindungsmodul gebunden sind. Darüber hinaus wird die Bildung der Dimere durch den proteingebundenen Cy5 selbst katalysiert (Gruber et al. 2000). Bei zu hoher Farbstoffsubstitution an das Bindungsmodul der fluorochromen Sonde und/oder Injektion einer zu großen Menge Fluoreszenzfarbstoff in den Organismus wird demzufolge die Fluoreszenz eines erheblichen Teils der Farbstoffmoleküle im Zielgebiet ausgelöscht. Das detektierte Signal fällt zu niedrig im Vergleich zur tatsächlichen, im Zielgebiet vorliegenden Sondenmenge aus.

In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Nebenwirkungsrate des ICG sehr niedrig ausfällt. Lediglich 8 von 1226 Patienten erlitten Gegenreaktionen während einer Videoangiographie, darunter war lediglich 1 schwerwiegende Reaktion zu verzeichnen (Hope-Ross et al. 1994). Vitalitätsuntersuchungen an Makrophagen nach Inkubation mit ICG oder dessen Derivaten, den Hemicyaninfarbstoffen Dy-681 und Dy-676, haben gezeigt, dass ICG zytotoxische Effekte aufweist (12 % Vitalität nach 72 h und 100×10^{-6} mol/l ICG-Konzentration). Nach Inkubation mit den Hemicyaninfarbstoffen Dy-676 und Dy-681 ergab sich hingegen eine sehr viel höhere Vitalität (93 % nach äquimolarer Inkubationskonzentration und -zeit) (Pauli et al. 2009). Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der erhöhten Hydrophilität dieser Hemicyanine (Cascorbi und Forêt 1991). Man kann somit vermuten, dass die Nebenwirkungsrate der neuen Farbstoffe ähnlich niedrig wie die des ICG oder sogar noch niedriger ausfallen könnte. Tatsächlich konnten Ballou et al. zeigen, dass selbst die Injektion von 10 mg freiem Cyaninfarbstoff (entspricht 0,5 g/kg) keine bemerkenswerten Gegenreaktionen in Mäusen hervorrief (Ballou et al. 1997).

Es finden sich zahlreiche Beispiele für die erfolgreichen Anwendung von Cyaninfarbstoff-gekoppelter Sonden zur Detektion molekularer Ziele in Mäusen. Funovics et al. präsentierten beispielsweise eine aktivierbare Cy5.5-gelabelte Sonde (textitengl. to label - anheften) zur katheterbasierten Darstellung der Cathepsin B-Aktivität von Ovarialkarzinomen (Funovics et al. 2004) und Deissler et al. entwickelten eine Dy-676-Liposomen-Sonde zur Bildgebung von Ödemen als makrophagenvermit-

telte Entzündungserscheinung (Deissler et al. 2008).

2.1.4.2 Antikörper als Bindungsmodule fluorooptischer Sonden

Eine überaus erfolgversprechende Strategie zur Konstruktion neuer fluorooptischer Sonden war in jüngerer Zeit die Verwendung von Antikörpern (Immunglobuline) als Bindungsmodul. Diese Moleküle besitzen die nützliche Fähigkeit, Zielstrukturen bzw. Antigene mit großer Spezifität zu erkennen und eine hochaffine Bindung mit ihnen einzugehen.

Unter den verschiedenen Antikörper- bzw. Immunglobulin-Klassen eignet sich Immunglobulin G (IgG) (siehe Abbildung 7) am besten für experimentelle Untersuchungen. Dieses Molekül befindet sich in großen Mengen im Plasma, ist gut löslich und kann einfach aufbewahrt werden. Eine große Fülle isolierter IgG-Antikörper sind heute kommerziell erhältlich und mittels der Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein (Nobelpreis 1984) können monoklonale Antikörper mit intendierter Spezifität in potenziell unbegrenzter Menge produziert werden (Lottspeich und Engels 2006).

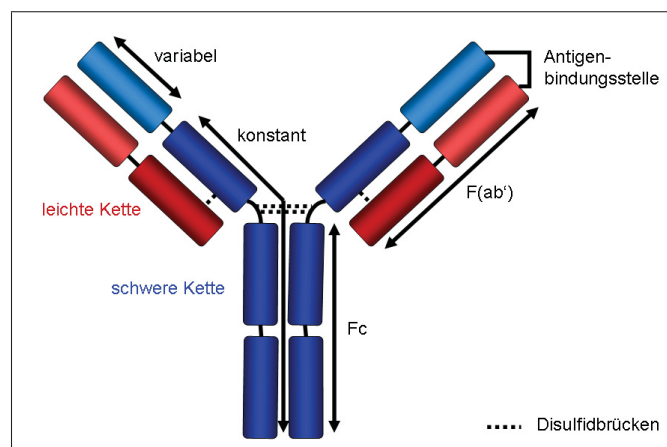


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls, bestehend aus 2 identischen schweren (50 kDa) und 2 identischen leichten (24 kDa) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Beide Ketten bestehen je aus einem konstanten und einem variablen Anteil, der mit seiner Antigenbindungsstelle die Antikörperspezifität auf ein bestimmtes Antigen vermittelt. Jeder Antikörper kann in ein kristallines Fragment (Fc - *engl.* fragment crystalline) sowie 2 antigenbindende Fragmente (F(ab') - *engl.* fragment antigen-binding) geteilt werden. Modifiziert nach Lottspeich und Engels (Lottspeich und Engels 2006).

Der praktikable Einsatz von Antikörpern zur Detektion molekularer Zielstrukturen wird reichlich erprobt: Für die nukleare Bildgebungsmethode der PET konnte ein ^{86}Y -gelabelter anti-Lewis Y-Antikörper zur Darstellung von Kolonkarzinomen entwickelt werden (Löfqvist et al. 2001), ein Gd-DTPA gelabelter anti-ICAM-1-Antikörper wurde zur Darstellung von Arthritis mittels MRT erfolgreich verwendet (Lee et al. 2009) und selbst bicompatible MRT/Nuklear-Sonden für die Detektion von Magenkarzinomen konnten effektiv eingesetzt werden (Liu et al. 6/2009). Computertomographisch darstellbar waren beispielsweise Liposomen-gelabelte anti-ICAM-1-Antikörper zur Darstellung atherosklerotischer Plaques (Danila et al. 2009). Auch als effektvolles Bindungsmodul fluorchromer Sonden dienten Antikörper in der jüngeren Vergangenheit: Beispiele hierfür sind die gegen Brustkrebsrezeptoren gerichtete HER2/neu-Sonde (Hilger et al. 2004), die gegen ein Makrophagen-Antigen gerichtete Cy5.5-gelabelte F4/80-Sonde zur frühen Bildgebung von Arthritis in Mäusen (Hansch et al. 3/2004) sowie ein hochreaktiver QDot 800-gekoppelter Antikörper, welcher zur Detektion des in Karzinomen vorkommenden, prognostisch ungünstigen Tn-Antigens diente (Danussi et al. 2009). Alles in allem

bewiesen sich Sonden in Form von cyaningebundenen Antikörperkonjugaten für die molekulare Bildgebung bisher nicht nur als hinreichend stabil sondern auch als gut *in vivo* detektierbar (Ballou et al. 1997).

2.2 Bedeutung pharmakokinetischer Betrachtungen für die molekulare Bildgebung

Beim Einsatz neuer fluorooptischer Sonden *in vivo* spielt es eine essentielle Rolle, dass das Kontrastmittel die Ankerstruktur für einen genügend langen Zeitraum und in genügend hoher Konzentration erreicht. Nur dann kann es in ausreichender Menge binden, um detektierbar zu sein (Weissleder und Mahmood 2001). Auf dem Weg zum Ziel unterliegt die Sonde den Gesetzen der Pharmakokinetik.

Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit den Veränderungen der Konzentration von Wirkstoffen im Organismus in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. Sie umfasst verschiedene Teilprozesse, die dem sogenannten LADME-Dogma der Biopharmazie folgen. Es steht für Liberation (Freisetzung), Adsorption (Aufnahme in die Blutbahn), Distribution (Verteilung im Organismus), Metabolismus (Verstoffwechslung) und Exkretion (Ausscheidung) der untersuchten Substanz. Freisetzung und Adsorption eines Pharmakons sind bei i. v.-Applikation jedoch vernachlässigbar (Mutschler et al. 2008).

Die Verteilung ist beispielsweise von Organ- und Gewebedurchblutung sowie pH-Differenz von Plasma und Gewebe abhängig. Außerdem muss das fluorooptische Kontrastmittel auf dem Weg zum Zielgebiet, d. h. zu der von der Krankheit betroffenen Region des Organismus, verschiedene biologische Hindernisse überwinden. Hierzu zählen beispielsweise die Gefäßwand, das Interstitium, der Extrazellularraum, manchmal sogar die Zell- oder Kernmembran (Grimm und Wunder 2005). Es ist zudem nötig, der sofortigen Elimination durch Leber und Niere zu entgehen, um in ausreichender Konzentration am Zielort anzulangen. Gleichzeitig sollen in den nicht zu untersuchenden Körpergeweben jedoch möglichst niedrige Sondenkonzentrationen auftreten, um etwaige Wechsel- und Nebenwirkungen zu minimieren und die Abgrenzbarkeit des Zielsignals vom Hintergrundrauschen, d. h. die signal-to-noise-ratio (*dt.* Signal-Rausch-Verhältnis), während der Detektion zu maximieren. Dies kann vor allem in der Umgebung von Entzündungen und Tumoren komplikationsreich sein, da der Übertritt des Kontrastmittels durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität in solchen Gebieten erleichtert wird. Somit entstehen starke Hintergrundsignale, was zu einer niedrigen SNR führt (Grimm und Wunder 2005).

Vor allem auch die kontrastmitteleigenen Stoffeigenschaften spielen eine enorme Rolle für Distribution, Metabolismus und Exkretion bildgebender Substanzen. Bindung an Plasma- und Gewebeproteine, Löslichkeit und chemische Eigenschaften (z. B. Ladung) sind derartige Charakteristiken. Einige Moleküle können auch stoffspezifische Interaktionen mit bestimmten Geweben oder Zellen eingehen. Einen ebenso fundamentalen Effekt auf die Verteilung innerhalb der Körpergewebe kann zudem die *Molekülgröße* haben (Choi et al. 2009).

Pharmakokinetische Versuchsreihen können entscheidende Erkenntnisse für die Vorhersagbarkeit des Vorkommens (Konzentration und Dauer) am Wirkort bringen und somit zum wesentlichen Informationsgewinn über die Qualität neuer Kontrastmittel in der optischen Bildgebung beitragen. Übliche Methoden sind dabei die Bestimmung der Menge der gesuchten Substanz und gegebenenfalls deren Metabolite in einer Kreislaufflüssigkeit (Blut, Plasma, Serum), im Harn und/oder in Biopsien verschiedener Gewebe (Gupta et al. 2002). Unklar bleibt hierbei jedoch, ob die targetspezifische Sonde im lebenden Organismus in ausreichender Menge an den Zielort gelangt. Man kann ebenfalls nicht vorhersagen, welche Menge des Kontrastmittels sich mit welcher Geschwindigkeit in den

normalen Geweben, wo eine eventuelle Toxizität hervorgerufen wird, verteilt und mit welcher Kinetik die Substanz aus den einzelnen Körperregionen eliminiert wird. Realistische Antworten auf diese überaus entscheidenden Fragen können möglicherweise molekulare Bildgebungsmethoden liefern. Beispielsweise konnten in jüngerer Zeit nukleare Bildgebungsmethoden für die *in vivo*-Messung pharmakokinetischer Parameter erfolgreich eingesetzt werden. So erfolgten Konzentrationsmessungen von ^{11}C -PD153035, einem radiogelabelten Liganden des Epidermal Growth Factor (*dt.* epidermaler Wachstumsfaktor, Abkürzung EGF), mit Hilfe der PET bei gesunden Probanden (Liu et al. 2/2009). Aber auch optische Bildgebungsverfahren sind auf dem besten Wege, diese Domäne für sich zu gewinnen. Kossodo et al. detektierten und quantifizierten z. B. fluorochromgekoppelte und gegen Integrine gerichtete Peptide mittels Fluorescence Molecular Tomography *in vivo* (Kossodo et al. 2009). Profunde pharmakokinetische Daten zu *Hemicyanin*-gekoppelten Antikörpern sind in der Literatur bisher jedoch nicht zu finden.

2.3 Fluorooptische Antikörper- und Antikörperfragmentsonden mit unterschiedlichem Molekulargewicht

2.3.1 Modulationen des Molekulargewichts von Antikörpern

Durch Modulationen des IgG-Teils fluorooptischer Antikörpersonden kann deren Molekülgröße reduziert werden. Die Verkleinerung des Immunglobulins ist zum einen möglich mittels aufwändiger Herstellung rekombinater „Mini“-Antikörper, den mono- und multivalenten Einzelketten-Antikörperfragmenten (*engl.* single-chain variable fragment [scFv]). Zum anderen kann man das Protein durch die Endoproteasen Papain und Pepsin in die biologisch aktiven, Fc-freien Fragmente F(ab') (Molekülgröße 48 kDa) und F(ab)₂ (Molekülgröße 96 kDa) spalten und nur die antigenspezifischen Anteile nutzen (Gudihal et al. 2008, Lu et al. 2008). Bereits bekannt ist hierbei, dass diese Fragmente nach Kopplung mit dem Radionuklid ^{131}I im Vergleich zu ihrem „Muttermolekül“ IgG stark abweichende pharmakokinetische Parameter aufweisen (Covell et al. 1986).

2.3.2 Auswirkungen und pharmakokinetische Effekte der Modulation des Molekulargewichts von Antikörpern

Bei der Anwendung intakter Antikörper für fluorooptische Sonden ergeben sich laut bisherigen Studien bedeutende Nachteile. Hervorzuheben ist hier besonders das große Molekulargewicht des IgG-Moleküls (150 kDa). Dieses verursacht die geringe Fähigkeit der recht großen Antikörper, biologische Barrieren (vaskulär, interstitiell, Zellmembran) effektiv zu überwinden (Jain und Batra 2003, Covell et al. 1986). Da IgG-Moleküle demzufolge nur sehr langsam in die Zielgebiete diffundieren, ergibt sich eine enorme Zeitspanne bis zur maximalen Dosisablagerung (Reilly et al. 1995, Jain und Batra 2003). Solch eine langsame Gewebeaufnahme führt aber auch zu verlängerter Clearancekinetik (*engl.* clearance - Gängigkeit, Beseitigung), extrem langer Serumhalbwertszeit (z. B. Rituximab 445 h) und starker Plasmaträgheit - ungünstige Faktoren, die ein starkes Hintergrundrauschen bei der Nutzung intakter Antikörper als Bindungsmodul von Sonden hervorrufen (Batra et al. 2002).

Solch entscheidende pharmakokinetische Eigenschaften wie Halbwertszeit und Biodistribution des IgGs werden stark durch das Fc-Fragment beeinflusst, welches etwa ein Drittel der gesamten Molekülgröße (53 kDa) einnimmt (Böger et al. 1995, Gudihal et al. 2008). Bei Verkleinerung des Antikörperteils fluorooptischer Sonden durch Abspaltung des kristallinen Fragments wird nun ein effektiver-

es Eindringen in die Zielgewebe erwartet, da die Plasmaträgheit nachweislich abnimmt (Holliger und Hudson 2005). Das IgG besitzt beispielsweise ein Interstitium:Plasma(I:P)-Verhältnis von weit unter 1 für fast alle Organe. Das I:P-Verhältnis steigt jedoch nach Endoproteasen-Spaltung in fast allen Geweben deutlich an - je kleiner das Spaltprodukt, desto deutlicher (Covell et al. 1986).

Da die kleineren, Fc-freien Antikörperfragmente $F(ab')$ und $F(ab')_2$ schneller ausgewaschen und erwartungsgemäß nicht wie das IgG hauptsächlich über den Magen-Darm-Trakt, sondern zu größeren Teilen auch über die Niere ausgeschieden werden können (Covell et al. 1986), nimmt man zum einen die schnellere Sichtbarkeit spezifischer Bindungen und zum anderen die Minimierung des unerwünschten Hintergrundsignals an. Ein zusätzlicher Vorteil der kleineren Antikörperspaltprodukte ist die Tatsache, dass sie aufgrund des fehlenden Fc-Fragments kaum oder gar keine Effektorfunktionen für das Immunsystem besitzen, da die Komplement- und Monozytenbindung des IgGs verhindert wird (Böger et al. 1995). Fc lockt Effektormoleküle und spezialisierte Killerzellen (Makrophagen) an, die Zellen angreifen, an denen der Antikörper andockt (*engl.* „antibody dependent cellular cytotoxicity“ - ADCC) und kann über Komplementaktivierung auch direkt zytotoxisch wirken (*engl.* „complement mediated cytotoxicity“). Dies kann bei der *in vivo*-Anwendung von körperfremden Antikörpern zu Unverträglichkeitsreaktionen führen, welche bei Verwendung von Fc-freien Antikörperspaltprodukten als Bindungsmodul fluorooptischer Sonden erwartungsgemäß geringer ausfallen dürften (Borchmann et al. 2001).

Es gibt somit zunehmend Beweise, dass Antikörperfragmente mit mittlerem Molekulargewicht ein idealer pharmakokinetischer Kompromiss sind zwischen den plasmaträgen Immunglobulinen einerseits und den schnell abgebauten, gut diffundierenden monovalenten Einzelketten-Antikörperfragmenten (scFv) andererseits. Ein Grund hierfür ist neben den oben genannten, dass die Avidität, d. h. die Bindungskraft, der $F(ab')$ - und $F(ab')_2$ -Fragmente zum Antigen im Gegensatz zum scFv noch stark genug ist, um spezifische Bindungen detektieren zu können (Batra et al. 2002). Denn je kleiner das Antikörperfragment, desto niedriger die Kraft der Antigen-Antikörperfragment-Bindung.

Zudem wurde die erfolgreiche Nutzung der hier aufgeführten Vorteile von Antikörperfragmentsonden bereits auf dem Gebiet der molekularen MRT-Bildgebung geprobt: *Ramakrishnan et al.* stellten 2008 eine Polyamin- und Gd-DOTA-gekoppelten $F(ab')_2$ -Sonde zur Darstellung von Amyloidplaques bei der Alzheimerkrankheit vor (Ramakrishnan et al. 2008). Bis zum jetzigen Zeitpunkt bleibt jedoch unbekannt, wie sich *Hemicyanin*-gekoppelte Antikörperfragmente - vor allem im direkten Vergleich zu den bereits bewährten, großmolekularen IgG-Sonden - bei der *in vivo*-Anwendung verhalten.

3 Ziele der Arbeit

Die Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebung stellt ein schnelles, kostengünstiges und hochempfindliches Verfahren für die nichtinvasive Darstellung molekularer Ziele dar. Sie birgt somit große Chancen für Diagnostik, Klassifizierung, Behandlung und Prognose vieler Erkrankungen. Es müssen zur Gewährleistung dessen entsprechende Kontrastmittel entwickelt werden, die den Gegebenheiten der Pathologie und Pathophysiologie dieser Krankheiten bestmöglich angepasst sind. Auf dem Weg dahin stellt vor allem die Optimierung der Pharmakokinetik bereits bewährter SONDENSYSTEME einen wichtigen Schritt dar. Obwohl umfangreiche Daten zur komplexen Pharmakokinetik von radiogekoppelten IgG-Sonden in der Literatur zu finden sind, fehlen bisher entsprechende Studien zu *Hemicyanin*-gekoppelten Antikörpern. Dementsprechend finden sich ebenso wenig Aussagen zur Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften entsprechender fluorochromer Sonden nach Reduktion des Molekulargewichts durch Abspaltung des Fc-Fragments. In der vorliegenden Arbeit wird somit die Notwendigkeit bedient, entsprechende Untersuchungen zu realisieren.

- Zunächst sollen durch Etablierung der enzymvermittelten Antikörperspaltung Antikörperfragmente aus Maus-IgG hergestellt und durch Kopplung an einen fluorochromen Farbstoff neue, kleinmolekulare, antigen*unspezifische* Antikörperfragmentsonden entwickelt werden. Diese sollen biochemisch charakterisiert werden.
- In weiteren Versuchen sollen mögliche Interaktionen einer der entwickelten kleinmolekularen Sonden mit Tumorzellen beispielhaft analysiert werden.
- Die *in vivo*-Kinetik der hergestellten fluorochromgekoppelten Antikörperfragmentsonden sollen in verschiedenen Tierversuchsmodellen untersucht und mit einer Antikörpersonde verglichen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Materialien

4.1.1 Geräte

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte mit zugehörigen Herstellerangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Geräte mit zugehörigen Herstellerangaben

Gerät	Hersteller
Accu-jet Pipettenakku	Brand, Wertheim, Deutschland
Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
bonSAI® (bio optical NIRF Small Animal Imager)	Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Deutschland
Brutschrank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einhängetermostat E100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply E 844	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage isocal AC 211P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Isofluran-Verdampfer Isotec 4	Datex Ohmeda GmbH, Duisburg, Deutschland
Laborabzug Labcontrol	Gebrüder TROX GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Germany
Laser-Scanmodul LSM510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axiovert200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Olympus CK 40	Olympus Europe GmbH, Hamburg, Deutschland
Perfect Blue™ Vertical Electrophoresis System 45-1010-i	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Schüttelinkubator 3031	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Spektrofluorometer Nanodrop 3300 v 2.7.0	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Spektrophotometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Tiefkühlschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Vacusafer	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Vakuumkonzentrator SPD SpeedVac 111V	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Variomag Elektronikrührer Mono	H+P Labortechnik GmbH, München, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y. USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4.1.2 Materialien

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien mit zugehörigen Herstellerangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Materialien mit zugehörigen Herstellerangaben

Material	Hersteller
Bechergläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA-Blutentnahmeröhrchen mit Kapillare	Kabe Labortechnik GmbH, Mümrecht-Elsenroth, Deutschland
Einmalspritze Injekt H 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmalspritze Injekt 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanüle 30 G	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmal-Küvetten Plastibrand	Brand GmbH & Co. GmbH, Wertheim, Deutschland
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fuldapipette 10 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glasflaschen	Schott GmbH, Jena, Deutschland
Glasmesspipetten Schellbach, Klasse A5, Hirschmann	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaspipetten 10 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaswolle	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
ImmunoPure® Fab Preparation Kit	PIERCE Biotechnology, Inc., Rockford, USA
ImmunoPure® Fab ₂ Preparation Kit	PIERCE Biotechnology, Inc., Rockford, USA
Insulinspritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
iCon™ Concentrators	PIERCE Biotechnology, Inc., Rockford, USA
Isopropanolbehälter	Qualilab, Olivet, Frankreich
Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kryokonservierungsröhrchen	Nalgene Products, Rochester, USA
Large-Tube-O-Dialyzer	Chemicon International, Inc., Hampshire, United Kingdom
Meßzylinder	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Histobond, Marienfeld, Bad Mergentheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim, Deutschland
Parafilm Laboratory Film PM-996	Pechiney Plastic Packaging Inc., Menasha, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
PP-Test-Tubes (Falcon-Tubes) 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma GmbH, Müllheim-Baden, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Rasierklingen Gillette	Procter & Gamble Germany GmbH & Co Operations oHG, Schwalbach am Taunus, Deutschland
Rundfilter	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Safe-Lock-Tubes (dt. Sicherheitsverschlussröhrchen) 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Ständer für Sephadex-Säule	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Thomakammer	Feinoptik, Bad Blankenburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (160 cm ² Wachstumsfläche)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

4.1.3 Chemikalien

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien mit zugehörigen Herstellerangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Chemikalien mit zugehörigen Herstellerangaben

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammonium-Persulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bromphenol-Blau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Brilliantblau G250	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Coomassie-Brilliantblau R250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Diethylether	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dy676-NHS-Ester	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol 96 %	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Flüssig-Stickstoff	Linde AG, Pullach, Deutschland
Glycerin	GibcoLife Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumbikarbonat (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumbutyrat	Invitrogen GmbH (GibcoLife Technologies), Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TE-MED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Permafluor	Immunotech, Marseille, Frankreich

Tabelle 3: Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti®-Mark STANDARD Protein-Molekulargewichtsmarker	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sodium Dodecylsulfate (SDS, dt. Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Sephadex G-25 Medium	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
TissueTek-Cryostatgel	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris-Glycine/SDS-Elektrophoresis-Puffer	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris/HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Trypsin	Invitrogen GmbH (GibcoLife Technologies), Karlsruhe, Deutschland
Tween	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
30 %iges Acrylamid/0,8 %iges Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

4.1.4 Immunglobuline

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immunglobuline mit zugehörigen Herstellerangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Immunglobuline mit zugehörigen Herstellerangaben

Immunglobulin	Hersteller
Maus- γ -Globulin (lyophilisiert)	Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, USA
Maus- γ -Globulin (gelöst)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

4.1.5 Zelllinien

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien mit zugehörigen Bezugsangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zelllinien mit zugehörigen Bezugsangaben

Zelllinie	Unternehmen
LS174T (humane Adenokarzinomzellen)	CLS Cell Lines Service, Heidelberg, Deutschland
A375 (maligne Melanomzellen)	CLS Cell Lines Service, Heidelberg, Deutschland

4.1.6 Zellkulturmedien

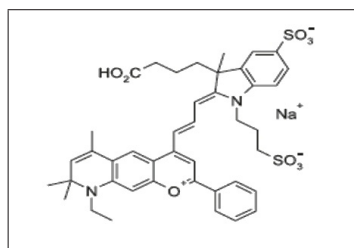
Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturmedien mit zugehörigen Herstellerangaben tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Zellkulturmedien mit zugehörigen Herstellerangaben

Zellkulturmedium	Hersteller
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen GmbH (GibcoLife Technologies), Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH (GibcoLife Technologies), Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen GmbH (GibcoLife Technologies), Karlsruhe, Deutschland

4.2 Der Nahinfrarotfarbstoff Dy-676

Der fluorochrome Hemicyaninfarbstoff Dy-676-NHS-Ester zeichnet sich durch ein deutliches Absorptions- und Emissionsverhalten im Nahinfrarotbereich des Lichtspektrums aus. Er eignet sich somit für die Anwendung in der NIRF-Bildgebung (siehe Abbildung 8 links).



Summenformel	C ₄₂ H ₄₅ N ₂ O ₉ S ₂ Na (freie Carbonsäure) C ₄₈ H ₄₈ N ₃ O ₁₁ S ₂ Na (Ester)
Absorptionsmaximum	674 nm
Emissionsmaximum	699 nm
Molekulargewicht	808,95 g/mol (freie Carbonsäure) 906,02 g/mol (Ester)
Extinktionskoeffizient	180.000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Sonstige Eigenschaften	löslich in Wasser, Methanol, DMF, DMSO

Abbildung 8: Der Dy-676-Farbstoff. Chemische Strukturformel der freien Carbonsäure (links) und Eigenschaften von freier Säure und verestertem Fluorochrom (rechts) (Dyomics GmbH 2007).

Die Quantenaubeute des in PBS gelösten Dy-676 beträgt unter Zugabe von BSA 0,31 (Pauli et al. 2009). Zum einen ist das Fluorochrom als freie Carbonsäure, zum anderen gebunden an eine reaktive Gruppe, den N-Hydroxysuccinimidyl(NHS)-Ester, erhältlich. Die freie Carbonsäure kann direkt als unspezifische Sonde verwendet werden und unterscheidet sich von seinem veresterten Äquivalent lediglich in Molekülstruktur und -größe, nicht jedoch in Emissions- und Absorptionsverhalten (siehe Abbildung 8 rechts). Der veresterte Farbstoff gehört zu den aminoreaktiven Farbstoffen und kann eine kovalente Bindung mit Proteinen eingehen. Hierbei erfolgt die nukleophile Substitution der NHS-Ester-Gruppe des Farbstoffes mit einer primären Aminogruppe des Proteins. Es wird ein pH-Wert zwischen 8 und 9 benötigt (siehe Abbildung 9).

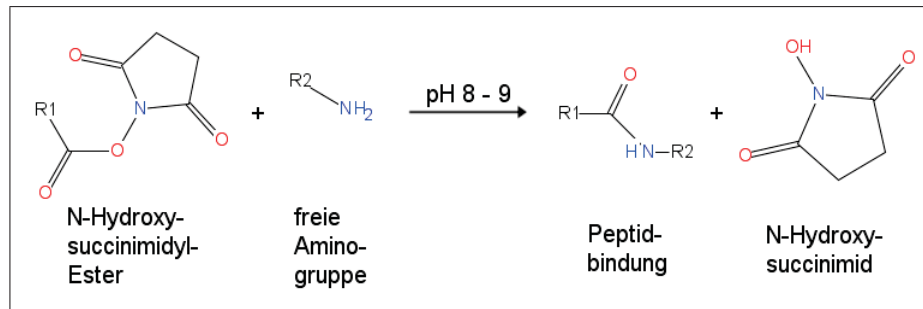


Abbildung 9: Nukleophile Substitution mit Bildung der Sonde bestehend aus Dy-676 als signalgebendes Modul und Protein als spezifisches Bindungsmodul. Modifiziert nach Dyomics GmbH (Dyomics GmbH 2007).

4.2.1 Ermittlung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Dy-676-Farbstoffs

Farbstoff-Stammlösung

100 μg Fluoreszenzfarbstoff Dy-676-Carbonsäure in 5 μl Ethanol 96 % gelöst

Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluß

10 M PBS

0,027 M KCl

1,37 M NaCl

0,015 M KH_2PO_4

0,08 M wasserfreies Na_2HPO_4

in 1000 ml A. dest. gelöst

pH auf 7,4 mit NaOH oder HCl eingestellt

Laut *Sernetz et al.* ist die Fluoreszenzintensität I_F abhängig von der Konzentration c des gemessenen Farbstoffs:

$$I_F = I_0 * \Phi * (1 - e^{-\epsilon_\lambda * c * d}) \quad (1)$$

Weitere Faktoren, die somit in die Formel der Fluoreszenzintensität eingehen, sind die Intensität des Anregungslichtes I_0 , die Quantenausbeute Φ , der für jeden Farbstoff individuelle molare Extinktionskoeffizient ϵ_λ und der Durchmesser d des gemessenen fluoreszierenden Objektes. Ein der Formel 1 entsprechendes Fluoreszenzintensitäts-Konzentrations-Diagramm ist in Abbildung 10 dargestellt.

Bei hohen Farbstoffkonzentrationen geht die Fluoreszenz dabei in Sättigung, während bei sehr niedrigen Werten des Exponenten die Näherung

$$\epsilon_\lambda * c * d \ll 1 \Rightarrow e^{-\epsilon_\lambda * c * d} \approx 1 - \epsilon_\lambda * c * d \quad (2)$$

gilt. Somit erhält man durch Einsetzen der Näherung 2 in die Formel 1 ein proportionales Verhältnis der Fluoreszenzintensität zur Konzentration bei niedrigen Konzentrationen an Farbstoff (Sernetz et al. 2000):

$$I_F = I_0 * \Phi * \epsilon_\lambda * c * d \quad (3)$$

Um zu untersuchen, ab welcher Dy-676-Konzentration die Fluoreszenzintensität I_F in ein lineares Verhältnis zu c übergeht, wurde aus der 24,7 mM Farbstoff-Stammlösung eine Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-9} mol/l Dy-676-Carbonsäure in 1 M PBS (pH 7,4) angelegt. Die Konzentrationsreihe konnte daraufhin mit dem Spektrofluorometer *Nanodrop 3300* vermessen werden.

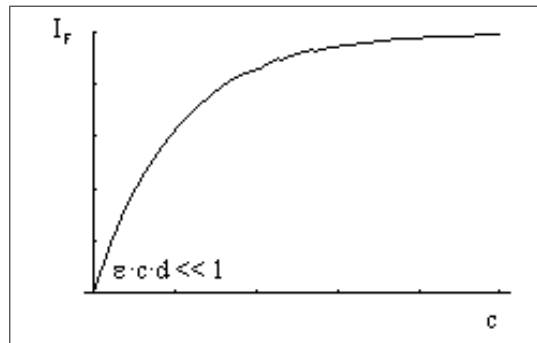


Abbildung 10: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration c . Bei sehr niedrigen Werten ($\gg 1$) für das Produkt $-\epsilon_{\lambda} * c * d$ geht die Fluoreszenzintensität in ein lineares Verhältnis zur Konzentration über (Sernetz et al. 2000).

4.3 Synthetisierung und biochemische Charakterisierung flourooptischer Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden

4.3.1 Herstellung und Aufreinigung von F(ab')

Lösung aus rekonstituiertem, unspezifischem Maus- γ -Globulin

10 mg lyophilisiertes Maus- γ -Globulin
in 1 ml Verdau-Puffer gelöst

Lagerungslösung für ProteinA-Säulen

0,1 % (w/v) NaN_3 in A. dest. gelöst

Die Herstellung von Maus-F(ab') erfolgte mit Hilfe des ImmunoPure® Fab Preparation Kits. Hierbei wurde eine nicht-spezifische Thiol-Endopeptidase eingesetzt, das Papain, welches aus den Kernen der Papaya-Frucht gewonnen wird. Durch die Spaltung von Disulfidbrücken in der Gelenkregion des ImmunglobulinG-Moleküls konnten die beiden antigenbindenden Fragmente F(ab') von dem kristallinen Fragment Fc getrennt werden (Mage 1980). Die anschließende Auftrennung der sich in gemeinsamer Lösung befindlichen F(ab')- und Fc-Fragmente erfolgte mittels Chromatographie an einer ProteinA-Säule (siehe Abbildung 11).

Zu Beginn wurden die ProteinA-Säule, der IgG-Bindungspuffer und der IgG-Eluierungspuffer auf Raumtemperatur aufgewärmt. Daraufhin wurden 0,5 ml einer 50 %-Gel-Aufschlämmung immobilisierten Papains in Glycerol mit 4 ml Verdau-Puffer in einem Reagenzglas gewaschen und dann durch einen Harz-Separator vom Überstand getrennt. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt und das Papain-Gel in 0,5 ml Verdau-Puffer resuspendiert, welcher Cystein zur Aktivierung der Endopeptidase enthielt.

Anschließend wurden 1 ml des rekonstituierten, unspezifischen Maus- γ -Globulins (10 mg/ml) hinzugegeben und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm für 16 h inkubiert. Nach der Trennung

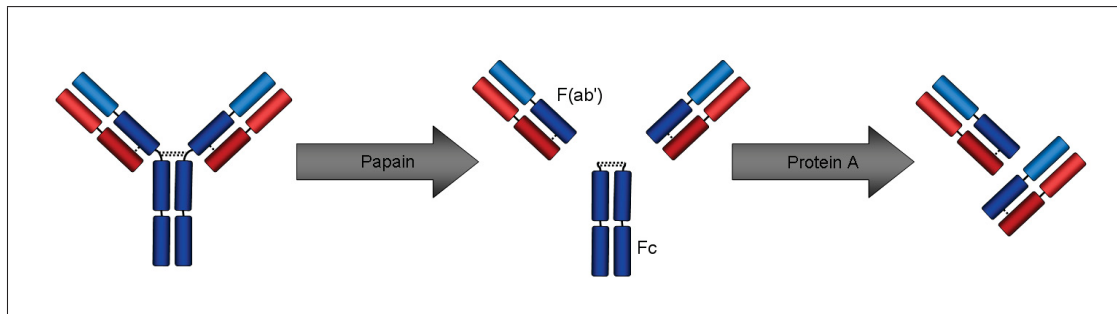


Abbildung 11: Darstellung des Verdau- und Aufreinigungsschemas für die Aufbereitung von F(ab')-Fragmenten aus IgG-Antikörpern. IgG-Moleküle wurden durch das Enzym Papain in je 2 F(ab')- und ein Fc-Fragment gespalten. Die Separation der F(ab')-Fragmente von den Fc-Fragmenten erfolgte mittels ProteinA-Säulenchromatographie. Modifiziert nach Pierce (Pierce 5/2005).

des Überstandes vom Papain-Gel mit Hilfe des Harz-Separators wurde das Gel mit 1,5 ml Bindungspuffer gewaschen. Waschlösung und Überstand wurden vermischt (die entstandene Lösung wird im Folgenden als Verdaulösung bezeichnet) und bei 4 °C gelagert.

Die Auftrennung der Verdaulösung in F(ab'), Fc und unverdautes IgG erfolgte durch Affinity PakTM ProteinA-Säulenchromatographie. ProteinA, welches ursprünglich aus der Zellwand von Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* stammt, besitzt die Eigenschaft, an der Fc-Region von Immunglobulinen zu binden (Fc-Rezeptor), nicht aber an der F(ab')-Region (Richman et al. 1982). Zunächst wurde die Säule durch Entfernen der Na-Azid-haltigen Lagerungslösung sowie Spülung mit 12 ml Bindungspuffer vorbereitet. Die Verdaulösung wurde aufgetragen und nach kompletter Aufnahme in der Säule wurden 6 ml IgG-Bindungspuffer nachgefüllt. Das Eluat (*lat.* eluere „auswaschen“) enthielt nun einzig die gereinigten F(ab')-Fragmente, welche in einem PP-Test-Tube (Falcon-Tube) aufgefangen und bei 4 °C gelagert wurden.

Zur Eluierung der nach dem Aufreinigungsverfahren in der ProteinA-Säule verbleibenden Fc-Fragmente, wurden daran 6 ml Eluierungspuffer eingefüllt. Der Durchfluss wurde in einem PP-Test-Tube gesammelt und bei 4 °C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Waschung der Säule durch Einfüllen von 10 ml IgG-Eluierungspuffer. Zur Lagerung bei 4 °C wurde die Säule mit 10 ml 0,1 % (w/v) NaN₃ in A. dest aufgefüllt.

4.3.2 Herstellung und Aufreinigung von F(ab')₂

Lösung aus rekonstituiertem, unspezifischem Maus-γ-Globulin

10 mg lyophilisiertes Maus-γ-Globulin
in 1 ml Verdau-Puffer gelöst

10 M PBS

siehe 4.2.1

Die Maus-F(ab')₂-Fragmente wurden mit Hilfe des ImmunoPure® Fab₂ Preparation Kits hergestellt. Dafür wurde die saure, nichtspezifische Endopeptidase Pepsin, die das Fc-Fragment des Immunglobulinmoleküls unterhalb der Gelenkregion enzymatisch aufspaltet, genutzt. Das F(ab')₂-Fragment, welches aus 2 durch Disulfidbrücken verbundenen F(ab')-Fragmenten besteht, konnte somit von mehreren Fc-Subfragmenten (pFc', etwa 27 kDa) abgespalten werden (Rousseaux et al. 1983,

Dissanayake und Hay 1975). Die $F(ab')_2$ -Fragmente wurden anschließend durch ProteinA-Säulenchromatographie und darauffolgende Dialyse von den Fc-Subfragmenten getrennt (siehe Abbildung 12).

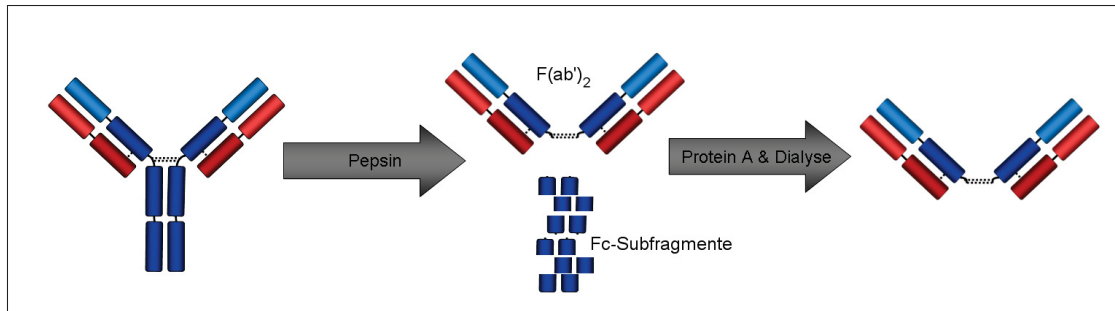


Abbildung 12: Darstellung des Verdau- und Aufreinigungsschemas für die Aufbereitung von $F(ab')_2$ -Fragmenten aus IgG-Antikörpern. IgG-Moleküle wurden durch das Enzym Pepsin in je 1 $F(ab')_2$ - und mehrere kleine Fc-Subfragmente gespalten. Die Separation der $F(ab')_2$ -Fragmente von den Fc-Subfragmenten erfolgte mittels ProteinA-Säulenchromatographie und Dialyse. Modifiziert nach Pierce (Pierce 1/2005).

Zu Beginn mussten ProteinA-Säule, IgG-Bindungspuffer und IgG-Eluierungspuffer auf Raumtemperatur angeglichen werden. Daraufhin wurden zu 0,25 ml der 50 %-Gel-Aufschlämmung immobilisierten Pepsins in Glycerol 4 ml Verdau-Puffer in einem Reagenzglas hinzugefügt. Der Überstand wurde durch den Harz-Separator entfernt. Dieser Waschvorgang wurde einmalig wiederholt und das Pepsin-Gel schließlich in 0,5 ml Verdau-Puffer resuspendiert.

Im Anschluss daran wurden 1 ml rekonstituiertes, unspezifisches Maus- γ -Globulin (10 mg/ml) beigefügt. Nach Inkubation des Ansatzes für entweder 4 h im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm wurde der Überstand mit Hilfe des Harz-Separators entfernt. Anschließend erfolgte die Waschung des Papain-Gels mit 1,5 ml Bindungspuffer. Dabei entstandene Waschlösung und zuvor gewonnener Überstand wurden vermischt (die entstandene Lösung wird im Folgenden als Verdaulösung bezeichnet), um mittels Chromatographie an der ProteinA-Säule weiterverarbeitet werden zu können.

Durch Entfernen der Lagerungslösung und Spülung mit 12 ml IgG Binding Buffer wurde die ProteinA-Säule vorbereitet. Die Verdaulösung konnte aufgetragen werden und nach kompletter Aufnahme in der Säule wurden 6 ml IgG Binding Buffer zugegeben. Das daraufhin entstandene Eluat enthielt $F(ab')_2$ -Fragmente und unerwünschte Fc-Subfragmente. Die Lösung wurde in einem PP-Test-Tube aufgefangen und 24 h bei 4 °C gelagert. Zur Eluierung der in der ProteinA-Säule verbliebenen Fc-Subfragmente und unverdauten IgG-Moleküle erfolgte die Rekonstitution wie in 4.3.1 beschrieben.

Mit den *Large-Tube-O-Dialyzern* erfolgte die Aufreinigung der $F(ab')_2$ -Fragmente aus dem Eluat. Dabei erfolgt ein Austausch von Lösungen über eine Membran mit bestimmter Porengröße. Auf Grund des Cut-off-Wertes (dt. „Ausschlussgrenze“) von 50 kDa wurden die 96 kDa schweren murinen $F(ab')_2$ -Fragmente im Tube zurückgehalten. Im Gegensatz dazu diffundierten die kleinen Fc-Subfragmente entgegen ihres Konzentrationsgradienten in die Austauschlösung. Die Durchführung der Dialyse erfolgte nach Angaben des Herstellers gegen 1 M PBS (pH 7,4).

4.3.3 Pufferaustausch mit *iCON™ Concentrators*

10 M PBS

siehe 4.2.1

In Hinblick auf die weitere Nutzung für SDS-PAGE und Farbstoff-Kopplung mussten die entstandenen Antikörperfragmente (siehe 4.3.1 und 4.3.2) in 1 M PBS (pH 7,4) umgepuffert werden. Bei der hierfür durchgeführten Ultrafiltration wurden Moleküle unter Verwendung der *iCON™ Concentrators* über eine permeable Membran mit einem Cut-off-Wert von 20 kDa separiert. Das Vorgehen erfolgte laut Angaben des Herstellers. Für das bereits bei der Herstellung gegen 1 M PBS (pH 7,4) dialysierte $F(ab')_2$ war dieser Vorgang nicht nötig (siehe 4.3.2).

4.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Bradford-Reagenz

0,01 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250

5 % (v/v) Ethanol 96 %ig

in A. bidest. gelöst

10 % (v/v) Phosphorsäure 85 % vorsichtig und langsam hinzugegeben

15 min gut durchmischt

filtriert, bei 4 °C gelagert

10 M PBS

siehe 4.2.1

Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten Proteinlösungen (siehe 4.3.1 bis 4.3.3) wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt, welche auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 an aromatische und basische Aminosäuren von Proteinen unter sauren Bedingungen basiert (Bradford 1976). In Folge dessen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Diese Veränderung ist spektrophotometrisch nachweisbar und die Menge des an Coomassie-Brilliantblau G-250 gebundenen Proteins somit quantifizierbar.

Die hergestellten Proteinlösungen beinhalteten verschiedene Puffer, welche möglicherweise mehr oder weniger starke Wechselwirkungen mit dem Bradford-Reagenz eingehen können. Zur Vermeidung falsch zu hoher oder zu kleiner Ergebnisse bei der Proteinquantifizierung mussten die entsprechenden Stammproteinlösungen, welche Maus- γ -Globulin als Referenz enthielten, deshalb die gleiche Pufferzusammensetzung wie die jeweils zu vermessende Proteinlösung aufweisen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Hergestellte Proteinlösungen (siehe 4.3.1 und 4.3.2) und Zusammensetzung der zugehörigen Stammproteinlösungen (lyophilisiertes Maus- γ -Globulin gelöst in den aufgeführten Puffern). Es ergaben sich Stammproteinlösungen mit gleicher Proteinkonzentration (0,56 mg/ml in 2 ml Probenvolumen).

hergestellte Proteinlösung	zugehörige Stammproteinlösung	
	lyophilisiertes Maus- γ -Globulin [mg]	Pufferzusammensetzung
Verdaulösungen	1,2	1 ml Verdaupuffer, 1 ml IgG-Bindungspuffer
F(ab')-Lösung	1,2	2 ml IgG-Bindungspuffer
F(ab') ₂ -Lösung	1,2	2 ml 1 M PBS
Fc- und Fc-Subfragment-Lösung	1,2	1 ml IgG-Bindungspuffer, 1 ml IgG-Elutionspuffer

hergestellte Proteinlösung	zugehörige Stammproteinlösung	
	lyophilisiertes Maus- γ -Globulin [mg]	Pufferzusammensetzung
F(ab')-, Fc- und Fc-Subfragment-Lösung nach Pufferaustausch	1,2	2 ml 1 M PBS

Auf Grundlage dieser Stammproteinlösungen konnten nun Eichreihen mit aufsteigenden IgG-Konzentrationen angelegt werden. Im Anschluss daran wurden jeweils 20 μ l der zu vermessenden Proteinlösungen bzw. der Eichreihenlösungen mit 80 μ l destilliertem Wasser und 1000 μ l Bradford-Reagenz vermischt und in Einmalküvetten überführt. Die Ansätze wurden im Spektrophotometer vermessen und es wurden je 3 Messungen pro Ansatz durchgeführt. Die Mittelwerte der Eichreihen-Messwerte konnten daraufhin in ein Konzentrations-Absorbanzen-Diagramm aufgetragen werden. Es erfolgte die Erstellung einer Eichkurve und die Proteinkonzentrationen der hergestellten Proteinlösungen konnten nach Einsetzen der gemessenen Absorbanzen in die entsprechende Eichreihen-Kurvengleichung berechnet werden.

4.3.5 Konzentrierung von Proteinproben

In Vorbereitung auf die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.6) mussten die nun mit PBS versetzten Proteinlösungen (siehe 4.3.3) 2 h im Vakuumkonzentrator aufkonzentriert werden. Die so gewonnenen Proben wurden erneut photometrisch quantifiziert (siehe 4.3.4).

4.3.6 Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamide-Gel-Elektrophoresis (SDS-PAGE)

0,5 M Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8 in A. dest.

1,5 M Trenngel-Puffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 in A. dest.

SDS-Stammlösung

10 % (w/v) SDS in A. dest.

APS-Stammlösung

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) in A. dest.

10 %iges Trenngel

33,3 % (v/v) 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid

19 % (v/v) 1,5 M Trenngelpuffer

0,75 % (v/v) SDS-Stammlösung

0,75 % (v/v) APS-Stammlösung

0,03 % (v/v) TEMED

10 ml (1 Gel)

3,33 ml

1,9 ml

75 μ l

75 μ l

3 μ l

in A. dest. gelöst	4,6 ml
<u>4 %iges Sammel-Gel</u>	<u>5 ml (1 Gel)</u>
13,2 % (v/v) 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	0,66 ml
25 % (v/v) 0,5 M Sammelgelpuffer	1,25 ml
0,5 % (v/v) SDS-Stammlösung	25 μ l
0,6 % (v/v) APS-Stammlösung	30 μ l
0,02 % TEMED	2 μ l
in A. dest. gelöst	3,1 ml

5 M Proben-Puffer

4 % (w/v) Tris-Base
 40 % (v/v) Glycerin
 0,1 % (w/v) EDTA
 13,3 % (w/v) SDS und
 0,07 % (w/v) Bromphenol-Blau
 in A. dest. gelöst
 pH mit HCL auf 6,8 eingestellt

Coomassie-Färbelösung

0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R-250
 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in A. dest. gelöst

Entfärbelösung

10 % (v/v) MeOH
 10 % (v/v) Essigsäure
 in A. dest. gelöst

Zur Charakterisierung der Proteinlösungen anhand des Molekulargewichtes wurde die Methode der SDS-PAGE (*engl.* sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli durchgeführt. Es handelt sich um eine Form der diskontinuierlichen zonalen Elektrophorese. Per definitionem spricht man von der Wanderung geladener Teilchen, hier Proteine, in einem elektrischen Feld durch ein als Trägermaterial dienendes Polyacrylamidgel (Pingoud et al. 2002). Das verwendete 10 %ige, kleinporige Trenngel (pH 8,8) wurde von einem 4 %igen, großporigen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet. Ziel dieses Vorgehens war es, die aufgetragenen Proteinproben vor der Separation zu konzentrieren. Verstärkt wird der Effekt durch das Vorhandensein von Chloridionen in Proben-, Sammelgel- und Trenngelpuffer, die nach Anlegen des elektrischen Feldes sehr schnell in Richtung der Anode wandern. Die Glyzinionen des Elektrophorese-Puffers bleiben weit zurück. In der dazwischen entstehenden ionenleeren Zone werden die negativ geladenen Proteine beschleunigt bis sie sich eng und aufeinander folgend sammeln. Treten die Glyzinionen daraufhin in das Trenngel über,

erhalten diese pH-abhängig eine negative Ladung. In Folge dessen überholen sie die Proteine, deren Mobilität durch den Siebeffekt der kleineren Gelporen begrenzt wird.

Das 10 %ige Trenngel wurde nach Herstellung sofort in die Gelkassette des *Perfect Blue™ Vertical Electrophoresis System 45-1010-i* eingegossen und mit Isopropanol überschichtet. Es polymerisierte für 20 min aus. Der Alkohol konnte daraufhin entfernt und das 4 %ige Sammelgel aufgestockt werden. Ein Gelkamm wurde luftblasenfrei eingefügt. Nach 1 h war das Sammelgel vollständig polymerisiert. Daraufhin konnte die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Tris-Glycine/SDS-Elektrophoresis-Puffer aufgefüllt werden.

Aufgetragen wurden je 10 μ l Probenvolumen mit 1 μ g Gesamtprotein je Tasche. Dazu wurden die durch die Verdauverfahren hergestellten, umgepufferten und konzentrierten (siehe 4.3.1 bis 4.3.5) Proteinlösungen entsprechend ihrer Konzentrationen mit destilliertem Wasser und je 2 μ l 5 M Probenpuffer vermischt. Er wurde in Anlehnung an Laemmli - jedoch unter Verzicht auf β -Mercaptoethanol - hergestellt, da jenes als reduzierendes Agens die Disulfidbrücken der Antikörperstruktur spaltet. Als Referenzen zur Molekülmassenbestimmung dienten Protein-Molekulargewichtsmarker, BSA mit bekanntem Molekulargewicht von etwa 69,3 kDa (UniProt-Consortium 2009) sowie in Probenpuffer und destilliertem Wasser gelöstes Maus- γ -Globulin. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 130 V bis die Lauffront des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus das untere Ende des Trenngels erreichte.

Im Folgenden wurde das Trenngel 30 min mit der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend 1 h in die Entfärbelösung gelegt. Färbung und Entfärbung wurden im Schüttelinkubator bei einer Schüttelfrequenz von 30 /min und einer Temperatur von 22 °C durchgeführt.

Da das Verfahren in Anwesenheit von SDS durchgeführt wurde, ergibt sich die einfache lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Molaren Masse und der elektrophoretischen Mobilität (Shapiro et al. 1967).

4.3.7 Fluorochrome Kopplung von Antikörpern und Antikörperfragmenten

Kopplungspuffer

50 mM HCO_3 in A. dest., pH 9,0

Farbstoff-Stammlösung

1 mg Fluoreszenzfarbstoff Dy-676-NHS-Ester in 55 μ l DMF gelöst

Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluß

Maus- γ -Globulin-Lösung

1 mg lyophilisiertes Maus- γ -Globulin

in 1 ml Kopplungspuffer gelöst

10 M PBS

siehe 4.2.1

Zur Herstellung der fluorooptischen Sonden wurden sowohl 1 ml des gelösten Maus- γ -Globulins als auch je 1 ml der umgepufferten F(ab')- und F(ab')₂-Lösungen (siehe 4.3.3) mit je 20 μ l der Farbstoff-Stammlösung 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Separation von Dy-

Protein-Komplex und freiem Protein vom ungebundenen Farbstoff erfolgte durch Säulenchromatographie mit Sephadex G-25, einem vernetzten Dextrangel, dessen Porengröße zwischen 86 und 258 μm beträgt. Dazu wurden 30 g Sephadex-Medium mit 100 ml 1 M PBS (pH 7,4) versetzt und über 24 h bei 4 °C gelagert. Nach diesem Quellvorgang konnte das Gel blasenfrei in eine 10 ml-Fuldapipette überführt werden, deren Spitze zuvor mit etwas Glaswolle ausgestopft und mittels 1 M PBS (pH 7,4) equilibriert worden war. Nun wurde die jeweilige, bläulich gefärbte Farbstoff-Protein-Lösung auf die Säule gegeben. Als diese vollständig im Gel aufgenommen war, wurde mit 1 M PBS (pH 7,4) eluiert. Dabei trennte sich die Farbstoff-Protein-Lösung entsprechend der molekularen Größe in 2 sichtbare Fraktionen auf: eine untere, schnell laufende Bande mit dem größeren Dy-Protein-Komplex und freiem Protein sowie die obere Bande aus reinem Dy-676-NHS-Ester, welcher auf Grund seiner sehr viel niedrigeren Molekülgröße stärker in die Gelporen eindringt und somit langsamer läuft. Die Lösung aus Dy-Protein-Komplex und freiem Protein wurde in einem 10 ml-PP-Test-Tube aufgefangen und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Fraktion des reinen Dy-676-NHS-Esters wurde verworfen.

4.3.8 Bestimmung der Farbstoff-Protein-Verhältnisse fluorooptischer Sonden

10 M PBS

siehe 4.2.1

Stammproteinlösung

1,2 mg lyophilisiertes Maus- γ -Globulin

in 2 ml 1 M PBS (pH 7,4) gelöst ($c = 0,56 \text{ mg/ml}$)

Die aufgereinigten fluorchromen Sonden konnten nun näher untersucht werden. Dazu erfolgte die photospektrometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels der Methode nach Bradford (siehe 4.3.4), wobei eine mit 1 M PBS (pH 7,4) versetzte Stammproteinlösung zur Erstellung der Eichreihe (IgG-Konzentrationen von 0 bis 18,18 $\mu\text{g/ml}$) verwendet wurde. Für die Quantifizierung der Farbstoffkonzentrationen erfolgte die Überführung der fluorooptischen Sonden in Quarzküvetten. Im Anschluss daran konnten die Fluoreszenzintensitäten im Spektrophotometer entsprechend dem Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 200 - 900 nm gegen die Referenz, das Lösungsmittel PBS, vermessen und das jeweilige Absorptionsmaximum im Nahinfrarotbereich bestimmt werden. Das Lambert-Beersche Gesetz (Formel 4)

$$E_{\lambda} = c * \epsilon_{\lambda} * d \quad (4)$$

beschreibt den Zusammenhang zwischen der Absorption elektromagnetischer Strahlung und der gesuchten Konzentration c [mol] eines absorbierenden Inhaltsstoffs in Flüssigkeiten. Dabei stellt E_{λ} die gemessene Extinktion (*lat.* „Auslöschung/Abschwächung“) bzw. das Absorptionsmaximum und d den Durchmesser der Quarzküvette (1 cm) dar. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{λ} des Dy-676-Farbstoffs beträgt laut Herstellerangaben $180.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dy-676 in Methanol). Durch Umstellung von Formel 4 zu Formel 5 konnte die Dy-676-Konzentration (c_{Dy676} [mol]) der fluorooptischen Sonden berechnet werden:

$$c_{\text{Dy676}} = \frac{E_{\lambda_{\text{Dy676}}}}{\epsilon_{\lambda} * d} \quad (5)$$

Somit ergibt sich das Farbstoff-Protein-Verhältnis nach Mujumdar et al. (Abkürzung D/P, Formel 7, Proteinkonzentration $c_{Protein}$ in mol) durch Einsetzen von Formel 5 in Formel 6 für die Dy-676-Sonden folgendermaßen (Mujumdar et al. 1996):

$$\frac{D}{P} = \frac{c_{Dy676}}{c_{Protein}} \quad (6)$$

$$\frac{D}{P} = \frac{E_{\lambda_{Dy676}}}{\epsilon_{\lambda} * d * c_{Protein}} \quad (7)$$

In gleicher Weise wurde das Farbstoff-Proteinverhältnis einer fluorochromen antiCEA-F(ab')-Dy-Sonde bestimmt. Hierbei handelt es sich um spezifisch auf das Carcinoembryonale Antigen (CEA, siehe 4.5.1) gerichtete Maus-F(ab')-Fragmente, welche ebenfalls an den Farbstoff Dy676 gekoppelt wurden. Entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde die Sonde von Frau Görmer, Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Institutes für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (IDIR) Jena.

4.3.9 Untersuchungen zur Quantenausbeute von F(ab')-Dy

Spektroskopische Messungen und Datenauswertungen zur Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ wurden in Kooperation mit Frau Dr. Jutta Pauli am Bundesamt für Materialforschung und -prüfung Berlin durchgeführt. Die unspezifische F(ab')-Dy-Sonde wurde in einer 5 % (w/v) BSA-Lösung in 1 M PBS (pH 7,4) gelöst. Als Referenzen wurden der Standardfarbstoff Rhodamin 101 gelöst in Ethanol sowie 9 M Styryl [1-(4'-Dimethylaminophenyl)-2(4"-methylpyridinium)-ethylen] gelöst in Methanol verwendet. Die Proben wurden im Spectrophotometer Cary 5000 (Varian, Palo Alto, Calif) bei 25 ± 2 °C vermessen. Unter Nutzung des Standards Rhodamin 101 ($\Phi = 1.0$) wurde die Quantenausbeute Φ der Styryl-Lösung berechnet. Daraufhin konnte die Quantenausbeute des F(ab')-Dy-Farbstoffs aus dem integrierten, blanken und spektralkorrigierten Emissionsspektrum im Vergleich zum 9 M Styryl gelöst in Methanol ermittelt werden. Die Untersuchungen wurden jeweils 1 mal wiederholt.

4.4 Das Bildgebungsinstrument *bonSAI@*

Die Fluoreszenzdetektion wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeiten mit Hilfe des planaren Bildgebungssystems *bonSAI@* (*bio optical NIRF Small Animal Imager*), einem Ganzkörper-Nah-Infrarot-Detektor für lebende Kleintiere, durchgeführt. Dieses besteht aus Aufnahmekasten, Lichtquelle mit Lichtleitfaser und Optikkopf, welche mit einer Arbeitsstation und einem TFT (*thin film transistor*)-Monitor verbundenen sind. Die Bedienung des Systems erfolgte über die *syngo*-Software (*Siemens AG Medical Solutions*, Erlangen, Deutschland), das Siemens Clinical User Interface für die medizinische Bildverarbeitung. Das Tier oder Untersuchungsobjekt wird auf einer Einschubplatte in den mattschwarz ausgekleideten Aufnahmekasten geschoben. Dies sichert einen gleich bleibenden Abstand desselben zu Lichtquelle und Kamera. Die bestmögliche Ausrichtung des Objektes im optimalen, gleichmäßig beleuchteten Untersuchungsbereich wird durch eine 13 cm große, kreisförmige Markierung auf der Platte gewährleistet. Mittels einer 150 Watt Halogenlampe wird Weißlicht über die Lichtleitfaser in den Ringdiffusor des Optikkopfes übertragen. Ein eventuell uneinheitliches Beleuchtungsprofil des Ringlichtes kann automatisch mathematisch korrigiert werden. Zusätzlich sind

die Lichtintensität und verschiedene Wellenlängenbereiche unter Verwendung definierter Filter einstellbar (siehe Tabelle 7). Dadurch eignet sich das System neben Ganzkörper-Aufnahmen auch für die Fluoreszenz-Bildgebung von Objekten und Kleintieren.

Tabelle 7: Beschreibung der Wellenlängenbereiche der Interferenzfilter des Ganzkörper-Nah-Infrarot-Detektors für lebende Kleintiere *bonSAI*®. FWHM steht für „full width half maximum“ (Halbwertsbreite) der Emissionsfilter. OD gibt die optische Dichte oder auch Absorbanz des Graufilters an, d. h. die Stärke der Abschwächung des hindurchtretenden Lichtes.

Filter Absorptions-/Emissionsmaximum	Anregung (nm)	Emission FWHM (nm)
447/527	420-475	527 HW 26
527/610	500-555	610 HW 23,5
660/735	645-675	735 HW 30
662/735	650-745	800 HW 30
Weißlicht	400-745	4 OD Graufilter

Das von den Fluorochromen im Untersuchungsobjekt zurückgestrahlte Licht tritt durch den Emissionsfilter bevor es von einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device, dt. ladungsgekoppeltes Bauelement, dient dem Transport elektrischer Ladungen) aufgenommen wird (siehe Abbildung 13).

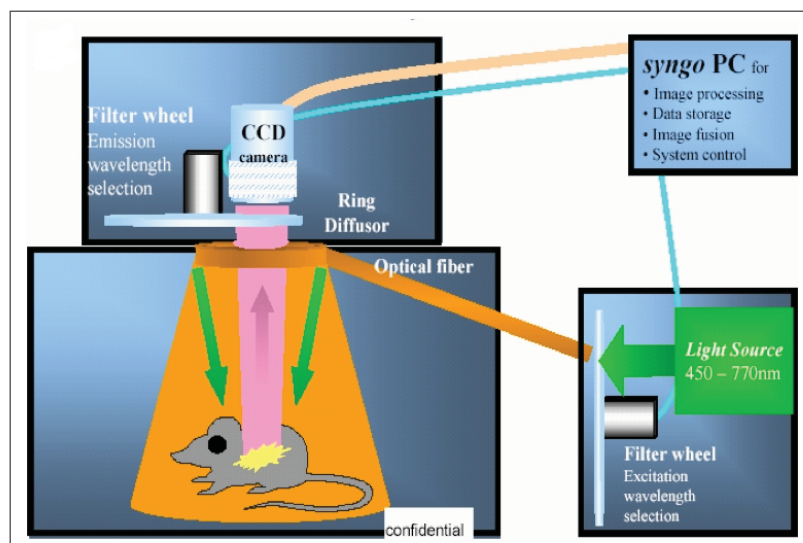


Abbildung 13: Aufbau des Bildgebungsinstruments *bonSAI*® und schematische Darstellung der Funktionsweise. Die zu messende Probe bzw. das Versuchstier wird mit Nahinfrarotlicht definierter Wellenlänge angeregt, das emittierte Licht von einer CCD-Kamera detektiert und die gewonnenen Daten an eine Arbeitsstation weitergeleitet (Siemens AG 2007).

Die Belichtungszeit war zwischen 0,1 und 120 sec variierbar. Auch die Auflösung der CCD-Matrix (*engl.* binning) in Dateiinformationen (*engl.* pixel) konnte verändert werden: Bei einer höheren Dichte von 1024 x 1392 Pixel entsprechend dem Binning Faktor (BF) 1 nimmt die räumliche Auflösung zu. Durch Auswahl des BF 2 (512 x 696 Pixel) hingegen erhöht sich das Signal-Rausch-Verhältnis.

Die von den Fluoreszenzfarbstoffen zurückgestrahlten Lichtintensitäten werden in 4096 Graustufen (entspricht 12 Bit, Abkürzung für binary digit, Maßeinheit für Datenmengen) von der CCD-Kamera aufgenommen. Dies erfolgt durch die Abgabe einer von der Ladung und somit der Photonenmenge abhängigen elektrischen Spannung. Die *syngo*-Software bereitet das Bild nun mittels Falschfarbendarstellung (siehe Abbildung 14) visuell auf. Mit Hilfe der manuellen Festlegung sogenannter ROIs

(engl. *region of interest*) kann eine Berechnung der in diesen Bereichen detektierten Fluoreszenzintensitäten erfolgen. Die so ermittelten semiquantitativen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung können für statistische Auswertungen herangezogen werden.

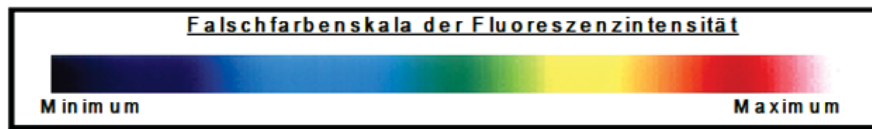


Abbildung 14: Farbliche Skaleneinteilung der Fluoreszenzintensitäten.

4.5 *In vitro*-Versuche

4.5.1 Kultivierung von Zelllinien

4.5.1.1 LS-174T-Zellen

LS174T-Zellen sind humane Adenokarzinomzellen des Dickdarms. Sie stammen von einer 58jährigen kaukasischen Frau, die an einem Kolonkarzinom der Klassifizierung Dukes Typ B erkrankt war. Diese Krebszellen überexprimieren Carcinoembryonales Antigen (CEA) (Tom et al. 1976), welches seit seiner Erstbeschreibung 1965 durch Gold und Freeman immer mehr an klinischem Interesse gewann (Gold und Freedman 1965). Biochemisch handelt es sich um ein Glykoprotein, das ein Molekulargewicht von 180 kDa und einen Kohlenhydratanteil von 50 bis 60 % besitzt. Ursprünglich wurde es in fetalem und malignem Gewebe des Verdauungstraktes gefunden (Coligan et al. 1975) und spielt heute für die Verlaufsdagnostik von Dickdarmtumoren im Klinikalltag eine große Rolle. Weiterhin wird CEA für die Beurteilung von Leber-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-(Pankreas-), Brust-(Mamma-) und Lungenkrebs herangezogen. Eine etwas geringere Bedeutung trägt das Molekül bei der Einschätzung von Gebärmutterhals-(Zervix-), Schilddrüsen- und Speiseröhren-(Ösophagus-)Tumoren. Steigerungen des Expressionslevels von CEA lassen eine Metastasenbildung infolge der genannten onkologischen Erkrankungen vermuten, können aber auch bei Rauchern und im Rahmen von Entzündungen auftreten.

4.5.1.2 A-375-Zellen

Die humane Zelllinie A-375 wurde 1973 von Giard etabliert (Giard et al. 1973). Man entnahm diese Zellen einem malignen Melanom, welches bei einer 54-jährigen Patientin diagnostiziert worden war. Diese Krebsart überexprimiert kein CEA (Hilger, persönliche Mitteilung).

4.5.1.3 Zellkultivierung

10 M PBS

siehe 4.2.1

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die humane Zelllinie LS-174T wurde in Minimal Essential Medium (MEM) und die A-375-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(DMEM) kultiviert. Beide Zelllinien wurden mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum versetzt und in sterilen Zellkulturflaschen im Brutschrank aufbewahrt. Die Standardwachstumsbedingungen wurden auf 37 °C, 5 % CO₂-Partialdruck und 90 % relative Luftfeuchtigkeit festgelegt. Alle 2-3 Tage erfolgte eine Passagierung der Zellen. Dazu musste das alte Medium entfernt und die adhären wachsenden Zellen 3-mal mit 1 M PBS (pH 7,4) gewaschen werden. Nun wurde der Zellrasen zur Ablösung mit Trypsin inkubiert und unter Zugabe von frischem Medium suspendiert. Nach Abnahme von 200 µl dieser Suspension für die Zellzählung wurde diese 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen, um das zellschädliche Trypsin zu entfernen. Nach Resuspension der Zellen im jeweiligen Medium konnten 4 x 10⁶ Zellen abgenommen und in eine frische Zellkulturflasche gegeben werden. Zur Steigerung der Expression von CEA wurden LS-174T-Zellen mit 2 mM Natriumbutyrat stimuliert. Während der Stimulationszeit von 14 Tagen erfolgte keine Zellpassagierung, lediglich ein Mediumwechsel wurde durchgeführt. Nach 2 Wochen wurden die Zellen mit Accutase von der Plastikmatrix gelöst und entsprechend ihrer weiteren Verwendung verarbeitet.

4.5.1.4 Bestimmung der Zellzahl

10 M PBS

siehe 4.2.1

Trypanblaustammlösung

200 mg Trypanblau

in 50 ml 1 M PBS (pH 7,4) gelöst

Die Gesamtzahl der sich in Kultur befindlichen Zellen wurde durch mikroskopische Auszählung in der Thomazählkammer ermittelt. Dies ist ein stark verdickter Objektträger, der zentral eine plane, rechteckige Vertiefung aufweist. Darin befindet sich ein eingezähtes Raster aus 16 aneinandergefügt Großquadraten, die jeweils 16 Kleinquadrate umfassen (siehe Abbildung 15).

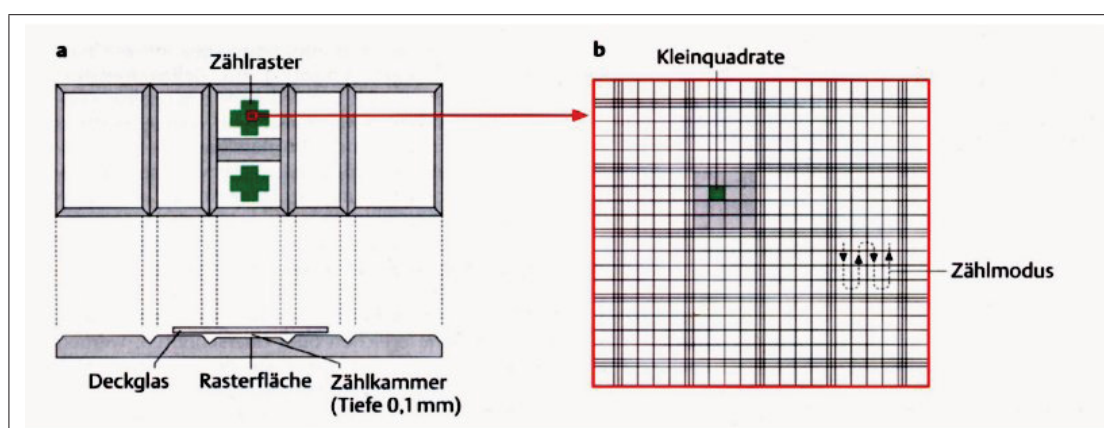


Abbildung 15: Zählkammer nach Thoma. (a) Aufsicht mit Darstellung des Zählrasters und Schnittbild mit Darstellung von Deckglas, Rasterfläche und Zählkammer, die eine Tiefe von 0,1 mm besitzt. (b) Das Zählraster besteht aus 16 Großquadraten (grau), von denen jedes in 16 Kleinquadrate (grün) gegliedert ist. Die gestrichelte Linie zeigt, wie bei der Zellzählung vorgegangen wird. Zellen, die auf der unteren und der linken Grenzlinie des Kleinquadrates liegen, werden eben diesem Kleinquadrat zugerechnet, Zellen auf der oberen und rechten Grenzlinie werden nicht mitgezählt (Richter 2003).

Ein Deckglas wurde mit gleichmäßigem Druck auf die zuvor angehauchten und somit angefeuchteten

Stege aufgeschoben. Daraufhin wurden 100 μl der Zellsuspension in einem 1,5 ml-Safe-Lock-Tube mit 900 μl Trypanblaustammlösung vermischt. Nun konnten 100 μl dieser Lösung vorsichtig unter das Deckglas der Thomakammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Dabei wurden nur diejenigen Zellen miteinbezogen, welche innerhalb des Kreuzes und welche genau auf den linken und dem unteren Rand lagen (siehe Abbildung 15). Mit Formel 8 wurde die Gesamtzellzahl im vorhandenen Suspensionsvolumen berechnet:

$$c_Z = \frac{n * f}{V_T} \quad (8)$$

Hierbei gibt c_Z Zellkonzentration [Zellzahl/ml], n die Anzahl der in der Thomakammer ausgezählten Zellen, f den Verdünnungsfaktor (10) und V_T das Volumen [ml] der Thomakammer über dem Raster (0,064 μl = $6,4 \cdot 10^{-8}$ ml) an.

4.5.1.5 Kryokonservierung

Kryokonservierungs-Medium

8 % (v/v) DMSO in Zelllinien-entsprechendem Kulturmedium gelöst

Die Kryokonservierung diente zur Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum. Es wurden 1 bis 5×10^6 Zellen bei der Passagierung abgenommen, sedimentiert bei 200 x g für 5 min, der Überstand dekantiert und in 1,8 ml gekühltem, kälteprotektivem Kryokonservierungs-Medium resuspendiert. Nun konnte die Zellsuspension in 2 ml Kryokonservierungs-Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde auf Eis gestellt, danach über Nacht bei -80 °C in einem Isopropanolbehälter gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

4.5.1.6 Auftauen von Zellen

Um die humanen Zelllinien LS-174T und A375 zu rekultivieren, wurden diese aus dem Flüssigstickstoff entnommen und umgehend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Zur Auswaschung des im Einfriermedium enthaltenen, bei Raumtemperatur zytotoxischen DMSO wurden 10 ml des entsprechenden Kultivierungsmedium zugegeben und die Suspension anschließend für 4 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 160 cm² Wachstumsfläche überführt.

4.5.2 Fluorooptische Messungen

10 M PBS

siehe 4.2.1

PBS-Tween-Puffer

1 M PBS (pH 7,4)

2 % (w/v) BSA

5 mM EDTA

0,2 % (v/v) Tween

Sowohl die mit Natriumpyruvat stimulierten LS-174T-Zellen als auch die ohne Stimulationszusätze kultivierten A-375-Zellen wurden mit Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml FACS-Puffer suspendiert. Nach erfolgter Zellzählung wurden je 1×10^6 Zellen pro Zelllinie in 3 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes gegeben und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen bei 300 x g sedimentiert, der Überstand verworfen und in 100 μ l PBS-Tween-Puffer resuspendiert. Nun wurden beide Zelllinien mit je 2,5 μ g (gemessen am Proteingehalt) der unspezifischen F(ab')-Dy676-Sonde (siehe 4.3.7) für 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Eine dritte Zellprobe diente als leere, nicht fluoreszierende Vergleichskontrolle. Nach abgeschlossener Inkubation konnten die Zellen bei 300 x g zentrifugiert und der Fluoreszenzdetektion mit Hilfe des Bildgebungsinstruments *bonSAI®* (siehe 4.4) zugeführt werden. Dazu erfolgte die Anordnung der 6 in den 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes enthaltenen Zellproben auf einer Messplatte. Anschließend wurden sowohl ein Lichtbild als auch Fluoreszenzbilder bei einem BF von 1 und einer variierenden Belichtungszeit von 0,5, 1, 1,5, 2, 3 und 6 sec im *bonSAI®*-Kleintierscanner aufgenommen. Um die Zellpellets wurden zirkuläre ROIs (Größe einheitlich entsprechend der mittleren Höhe der Zellpellets) gelegt und die absoluten Fluoreszenzintensitäten dieser Bereiche semiquantitativ gemessen.

4.5.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

10 M PBS

siehe 4.2.1

BSA-Tween-Puffer

2 % (w/v) BSA

5 mM EDTA

0,2 % (v/v) Tween

in 1 M PBS (pH 7,4) gelöst

BSA-Lösung für CLSM

2 % (w/v) BSA

in 2 ml 1 M PBS (pH 7,4) gelöst

DAPI-Lösung

1 % (w/v) DAPI

in BSA-Lösung für CLSM gelöst

F(ab')-Dy676-DAPI-Lösung

1 % (v/v) F(ab')-Dy676-Sonde

in DAPI-Lösung gelöst

Mit Hilfe des fluoreszenzmikroskopischen Verfahrens der CLSM (Abkürzung steht für confocal laser scanning microscopy, dt. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie) ist es möglich, das von einer Probe emittierte Licht aus einer genau definierten Schichtebene zu sammeln. Es handelt sich hierbei um

eine lichtmikroskopische Technik, deren theoretischen Grundlagen bereits 1957 von Marvin Minsky gelegt wurden. Über ein Objektiv wird das helle Licht eines Lasers auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene der Probe fokussiert. Anschließend erfasst ein Detektor (Photomultiplier) reflektiertes oder auch durch Fluorochrome emittiertes Licht und das Datenmaterial wird auf einem Computer gespeichert. Die in der Zwischenbildebene eingebrachte sehr kleine, variable Lochblende (*engl.* pinhole) fängt oberhalb und unterhalb dieser definierten Fokusebene emittiertes Streulicht ab. Die Anregung und Detektion erfolgt bei der CLSM rasterartig, d. h. „Punkt für Punkt“ und „Linie für Linie“. Dadurch lassen sich „optische Schnitte“ erfassen, aus denen mit entsprechender Software dreidimensionale Ansichten berechnet und angezeigt werden können.

Zu Beginn wurde unspezifische F(ab')-Dy676-Sonde (siehe 4.3.7) jeweils 1:100 mit DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindol)-BSA-Lösung vermischt. DAPI ist ein Fluorochrom, welches sich bevorzugt an AT(Adenosin-Thymin)-reiche Regionen der DNA anlagert und nach Anregung durch ultraviolettes Licht mit blauer bis cyaner Farbe fluoresziert (Kapuscinski und Yanagi 1979). Das Absorptionsmaximum liegt in Verbindung mit doppelsträngiger DNA bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Sowohl die mit Natriumpyruvat stimulierten LS-174T-Zellen als auch die ohne Stimulationszusätze kultivierten A-375-Zellen wurden mit Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml FACS-Puffer suspendiert. Nach erfolgter Zellzählung wurden 1×10^6 Zellen pro Zelllinie in je einem 1,5 ml-Safe-Lock-Tube gegeben und zweimal mit BSA-Tween-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen bei $300 \times g$ sedimentiert, der Überstand verworfen und in 1 ml BSA-Tween-Puffer resuspendiert. Es wurden 3 Objektträger pro Zelllinie vorbereitet. Dazu wurden je 20 μ l Zellsuspension (20.000 Zellen) auf den Objektträger getropft und unter Lichtschutz getrocknet. Anschließend wurden auf jede Zellprobe 20 μ l der BSA-Lösung gegeben. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur konnte die Lösung abgesaugt und 20 μ l der DAPI-F(ab')-Dy676-Lösung konnten auf die getrockneten Zellproben getropft werden. Nach einstündiger Inkubation wurden die Objektträger wiederum abgesaugt, in Färbekästen mit 1 M PBS (pH 7,4) gewaschen, mit Permafluor eingedeckt und bei 4 °C gelagert. Im Folgenden konnten die präparierten Zellen mit einem CLSM-System, bestehend aus dem inversen Mikroskop *Axiovert200M*, einem Argon-, einem UV- sowie zwei Helium-Neon-Lasern, einem Laser-Scanmodul *LSM510* und einer Arbeitsstation, untersucht werden. Die Analyse erfolgte zweifach, zum einen ohne und zum anderen mit Zwischenschaltung eines Langpassfilters. Dieser kann lediglich von Licht mit Wellenlängen um 650 nm durchdrungen werden und diente somit der Darstellung der Emission des Dy-676-Farbstoffes. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der *LSM510 Image Examiner* Software ausgewertet.

4.6 In vivo-Versuche

4.6.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die im Rahmen dieser Forschungsarbeiten durchgeführten Experimente wurden weibliche Mäuse (Stämme siehe 4.6.1.1 und 4.6.1.2) im Alter von 2 Monaten verwendet, die vom Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Jena stammten. Ihre Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Die Tiere erhielten artenspezifische Diäten und konnten ad libitum Wasser zu sich nehmen.

Manipulationen der Versuchstiere wurden in Anlehnung an internationale Richtlinien zum ethischen Gebrauch von Tieren nur durch dafür qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche wur-

den durch die regionale Ethikkommission und vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (AZ 02-18/04, 02-13/05 und 02-14/05).

4.6.1.1 *NMRI*-Mäuse

Der *NMRI*-Mausauszuchtstamm, welcher am Naval Medical Research Institute in den USA etabliert wurde, zeichnet sich durch eine große genetische Heterogenität aus. Dies wird durch Verpaarung der am wenigsten verwandten Elterntiere erreicht. Dank jener Eigenschaften eignet sich diese Gattung besonders für pharmakologische Fragestellungen, bei denen Erkenntnisse aus Versuchstieren auf andere Spezies mit großer genetischer Variabilität, wie z. B. den Menschen, übertragen werden sollen.

Die Fütterung der *NMRI*-Mäuse erfolgte mit *ssniff*-Spezialpellets V1534-300 (*ssniff Spezialdiäten GmbH*, Soest, Deutschland). Ihr durchschnittliches Gewicht zum Zeitpunkt der Experimente betrug 30 g.

4.6.1.2 *BALB/c/SCID*-Mäuse

Bei dem *BALB/c*-Mausstamm handelt es sich um homozygote Albino-Inzuchtmäuse. Ihre Kultivierung wurde von 1913 bis 1916 von Halsey Bagg etabliert (*BALB/c* - Bagg, albino). Die hier verwendeten Tiere besaßen außerdem den schweren kombinierten Immundefekt (*SCID* - severe combined immunodeficiency), welcher eine erhebliche hereditäre Störung des Immunsystems durch gleichzeitigen B- und T-Zelldefekt darstellt.

Die *BALB/c/SCID*-Mäuse hatten ein durchschnittliches Gewicht von 23 g und wurden mit der energiereichen *Altromin*-Sonderdiät C1100 (*Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG*, Lage, Deutschland) gefüttert.

4.6.2 Implantation von Tumoren

In Vorbereitung auf die Tumorumplantation mussten nach der Zellzählung 1×10^7 LS-174T-Zellen, welche über 14 Tage mit Natriumpyruvat stimuliert worden waren, sowie 1×10^7 A375-Zellen aus der Suspension abgenommen werden. Danach wurden die Zellsuspensionen 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in jeweils 300 μ l Matrigel, einem gelatinösen Proteingemisch, das zuvor auf 4 °C gekühlt worden war. Die weiteren Schritte wurden unter Lagerung auf Eis durchgeführt. Für die Zellinjektion musste sowohl das LS-174T-Zell-Matrigel-Gemisch als auch das A375-Zell-Matrigel-Gemisch in je eine 1 ml-Insulinspritze mit Kanüle aufgenommen und nachfolgend einer *BALB/c/SCID*-Maus subkutan gespritzt werden. Tiere dieses Mausstammes tolerieren humane Tumorzelllinien auf Grund ihres defizienten Immunstatus bekanntlich gut. Die Tiefenvariabilität der Injektionen von etwa 0,5 mm sind dabei vernachlässigbar klein. Die LS-174T-Zellen wurden an der rechten und die A375-Zellen an der linken vorderen Schulterseite implantiert. Das Verfahren fand bei insgesamt 5 *BALB/c/SCID*-Mäusen Anwendung.

4.6.3 Untersuchung der Biodistribution fluorochrom-markierter F(ab')-Fragmente an xenotransplantierten Mäusen

Die 5 tumorimplantierten *BALB/c/SCID*-Mäuse (siehe 4.6.2) wurden 7 bis 10 Tage vor den Untersuchungen zur Biodistribution von fluorooptischen, unspezifischen F(ab')-Fragmenten mit der *Altromin*-Spezialdiät C1039 (*Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland*) gefüttert. Diese Tiernahrung zeichnet sich durch einen niedrigen Gehalt an Pheophorbid a aus, einem fotoaktiven Abbauprodukt des Chlorophylls, und dient der Reduktion der Autofluoreszenz des Gastrointestinaltraktes.

Als die Tumoren auf einen Durchmesser von etwa 8 mm angewachsen waren, wurden der gesamte Brustbereich sowie die rechte Oberschenkelinnenseite rasiert. Nach Narkotisierung der Mäuse mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran erfolgten die somit schmerzfreien Injektionen von 40 µg F(ab')-Dy676 gelöst in 1 M PBS (pH 7,4) in die durch Rotlichtbestrahlung erweiterten Schwanzvenen. Damit das Tier narkotisiert, die Atmung jedoch stabil gehalten werden konnte, wurde die Isofluranmenge zwischen 2 und 5 % (v/v) angepasst. Die Tiere wurden vor sowie sofort, 2, 4, 8, 16 und 24 h nach Kontrastmittelapplikation im Ganzkörper-Nah-Infrarot-Detektor für lebende Kleintiere bonSAI® (siehe 4.4) vermessen. Von allen Mäusen wurden je 5 Fluoreszenzbilder bei 0,5, 1, 1,5, 2, 3 und 6 sec Belichtungszeit unter Verwendung des 660/735 nm-Filters und einem BF von 1 angefertigt. Daraufhin konnten der Tumorgroße entsprechend 8 mm große, zirkuläre ROIs um die LS174T- sowie die A375-Tumorregionen gelegt werden und die absoluten Fluoreszenzintensitäten dieser Bereiche semiquantitativ gemessen werden. Das Muskelgewebe der Oberschenkelinnenseite wurde als Referenzgewebe in gleicher Art vermessen. Da Muskelgewebe einen hohen Anteil an natürlichen Fluorophoren besitzt, ergibt sich eine hohe Autofluoreszenz in diesem Gewebe. Aus diesem Grund eignet es sich sehr gut als Referenzgewebe, da eine Mehranreicherung fluorooptischer Sonden in verschiedenen anderen Organen und Strukturen signifikant höhere Fluoreszenzen aufweisen sollte als das stark fluoreszierende Muskelgewebe - um eine sichere Abgrenzbarkeit zwischen Autofluoreszenz und durch fluorooptische Kontrastmittel hervorgerufene, d. h. induzierte Fluoreszenz zu erreichen. Nach 24 h erfolgte die Organ- und Gewebepräparation.

4.6.4 Untersuchung der Biodistribution von Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden an gesunden Mäusen

4.6.4.1 Blutkinetische Untersuchungen

Zur Analyse von An- und Abflutung der hergestellten fluorooptischen Sonden im Blut wurden 9 NMRI-Mäuse in 3 Gruppen (n = 3 Tiere) aufgeteilt (siehe Tabelle 8). Jedem Tier wurden vor Kontrastmittelinjektion 20 µl Blut mittels Kapillarröhrchen aus der durch Rotlichtbestrahlung erweiterten Schwanzvene entnommen und in je einem EDTA-Röhrchen gesammelt. Im Anschluss daran wurden unter Isoflurannarkose (siehe 4.6.3) 8 µg Kontrastmittel (gemessen am Proteingehalt, gelöst in 1 M PBS (pH 7,4)) in die erweiterten Schwanzvenen injiziert. Die Mäuse der Gruppe I erhielten IgG-Dy, Gruppe II F(ab')₂-Dy und Gruppe III F(ab')-Dy. Nach 5, 15, und 30 min sowie 1, 4, 24 und 48 h wurden jeder Maus wiederholt 20 µl Blut entnommen und wie in 4.7.1 beschrieben weiterverarbeitet.

Tabelle 8: Übersichtsdarstellung der in vivo-Versuchsreihen zur Blutkinetik von fluorooptischen Antikörper- und Antikörperfragmentsonden. Ein Kontrastmittel (F(ab')-Dy676, F(ab')₂-Dy676 oder IgG-Dy676) wurde in gleicher Menge (gemessen am Proteingehalt, gelöst in 1 M PBS (pH 7,4), entsprechende Menge an injiziertem Dy-Farbstoff angegeben) jeweils 1 Tiergruppe (n = 3) i. v. injiziert. Daraufhin erfolgten zu mehreren Zeitpunkten Blutentnahmen.

Tiergruppe	i.v.-Kontrastmittel-Injektion	Zeitpunkte der Blutentnahmen
I	8 μ g IgG-Dy676 $\hat{=}$ $5,48 \cdot 10^{-10}$ mol Dy	einmalig vor Kontrastmittel-Injektion 5, 15, 30 min p. i. 1, 4, 24, 48 h p. i.
II	8 μ g F(ab') ₂ -Dy676 $\hat{=}$ $4,64 \cdot 10^{-10}$ mol Dy	einmalig vor Kontrastmittel-Injektion 5, 15, 30 min p. i. 1, 4, 24, 48 h p. i.
III	8 μ g F(ab')-Dy676 $\hat{=}$ $1,45 \cdot 10^{-9}$ mol Dy	einmalig vor Kontrastmittel-Injektion 5, 15, 30 min p. i. 1, 4, 24, 48 h p. i.

Wie in Tabelle 8 zu erkennen, wurden den NMRI-Mäusen zwischen 10^{-10} bis 10^{-9} mol Dy injiziert. Unter der Annahme, dass sich die jeweilige Sonde kurz nach Injektion im gesamten Intravasalraum gleichverteilt, entspricht dies bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 20 ml einer maximalen intravasalen Farbstoffkonzentration von 10^{-12} bis 10^{-10} mol/l.

4.6.4.2 Untersuchungen zur Organdistribution

Die Verteilung der hergestellten fluorooptischen Sonden in verschiedenen Organen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ebenfalls an NMRI-Mäusen untersucht. Dazu wurden 30 Tiere in 10 Gruppen (n = 3 Tiere) aufgeteilt (siehe Tabelle 9). Alle Tiere erhielten 7 bis 10 Tage vor Experimentbeginn eine Pheophorbid-a-arme Diät (siehe 4.6.3), um die unerwünschte Autofluoreszenz der Gewebe zu reduzieren. Daraufhin wurden den ersten drei Gruppen (I-III) 50 μ g des Kontrastmittels IgG-Dy676, den Gruppen IV bis VI 25 μ g F(ab')₂-Dy676 und den Gruppen VII bis IX 50 μ g F(ab')-Dy676 unter Isoflurannarkose (siehe 4.6.3) i.v. injiziert (Kontrastmittelmenge jeweils gemessen am Proteingehalt, Kontrastmittel gelöst in 1 M PBS (pH 7,4)). Die Tiere der letzten Gruppe (X) erhielt als Nativ-Kontrolle kein Kontrastmittel. Die Tiere der Gruppen I, IV und VII wurden 1 h, die Tiere der Gruppen II, V und VIII 6 h und die Tiere der Gruppen III, VI und IX 24 h nach Kontrastmittelinjektion getötet. Die Tötung der Tiergruppe X erfolgte zeitunabhängig. Im Anschluss daran wurden die Organe Herz, Lunge, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Niere sowie das wiederum verwendete Referenzgewebe Muskel (Eignung als Referenz siehe 4.6.3) entsprechend aufgearbeitet (siehe 4.7).

Tabelle 9: Übersichtsdarstellung der in vivo-Versuchsreihen zur Pharmakokinetik von fluorooptischen Antikörper- und Antikörperfragmentsonden. Ein Kontrastmittel (F(ab')-Dy676, F(ab')₂-Dy676 oder IgG-Dy676) wurde in gleicher Menge (gemessen am Proteingehalt, gelöst in 1 M PBS (pH 7,4)) jeweils 3 Tiergruppen (n = 3) i. v. injiziert. Daraufhin erfolgte bei jeweils einer Tiergruppe die Organentnahme nach 1 h, bei einer weiteren nach 6 h und bei der dritten nach 24 h. Die Tiergruppe X diente als native Vergleichskontrolle, die Organentnahme erfolgte zeitunabhängig.

Tiergruppe	i.v.-Kontrastmittel-Injektion	Zeitpunkt der Organentnahme
I	50 μ g F(ab')-Dy676 $\hat{=}$ $2,68 \cdot 10^{-9}$ mol Dy	1 h p. i.

Tabelle 9: Fortsetzung

Tiergruppe	i.v.-Kontrastmittel-Injektion	Zeitpunkt der Organentnahme
II	50 μg F(ab') ₂ -Dy676	6 h p. i.
III	50 μg F(ab') ₂ -Dy676	24 h p. i.
IV	25 μg F(ab') ₂ -Dy676 $\cong 1,35 * 10^{-9}$ mol Dy	1 h p. i.
V	25 μg F(ab') ₂ -Dy676	6 h p. i.
VI	25 μg F(ab') ₂ -Dy676	24 h p. i.
VII	50 μg IgG-Dy676 $\cong 1,40 * 10^{-9}$ mol Dy	1 h p. i.
VIII	50 μg IgG-Dy676	6 h p. i.
IX	50 μg IgG-Dy676	24 h p. i.
X	keine	zeitunabhängig

Wie in Tabelle 9 zu erkennen, wurden den *NMRI*-Mäusen jeweils weniger als $1 * 10^{-8}$ mol Sonde injiziert. Die Dy-Konzentration im Gewebe konnte somit als sicher unter $1 * 10^{-8}$ mol/l eingestuft werden.

4.7 ex vivo-Versuche

4.7.1 Aufbereitung von Blutproben

Nach der Blutentnahme (siehe 4.6.4) wurden die EDTA-Blutproben 10 min bei 250000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher als Plasma definiert wird, wurde abpipettiert und in einen 0,5 ml-Safe-Lock-Tube gegeben. Die Blutplasma-Proben wurden bei -80 °C eingefroren und unter Lichtschutz gelagert.

4.7.2 Organ- und Gewebepräparation

Nach Abtöten sowohl der *BALB/c/SCID* als auch der *NMRI*-Mäuse durch Diethylether wurden diese auf einer Unterlage aufgespannt. Es wurde ein longitudinaler Schnitt vom Sternum nach kaudal in die äußere Haut und das Peritoneum gesetzt und die Bauchdecke eröffnet. Im Anschluss daran konnten die zu untersuchenden Gewebe freipräpariert werden. Die Entnahme von LS174T- und A375-Tumor sowie von Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz erfolgte 24 h nach F(ab')₂-Dy676-Applikation aus den *BALB/c/SCID*-Mäusen. Für die pharmakokinetischen Untersuchungen zu fluorooptischen Antikörper- und Antikörperfragmentsonden wurden den *NMRI*-Mäusen zu definitiven Zeitpunkten nach Kontrastmittelinjektion (siehe 4.6.4 Tabelle 9) Muskel, Herz, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Nieren und Milz entnommen.

4.7.3 Fluorooptische Messungen

Nachdem die Blutplasma-Proben wie unter 4.7.1 beschrieben aufbereitet worden waren, wurden diese wie in Abbildung 16 dargestellt auf einer bonSAI®-Messplatte platziert. Im Anschluss daran erfolgten die Aufnahme eines Lichtbildes der Proben sowie die Erstellung von Fluoreszenzbildern unter Verwendung des 660/735 nm-Filters bei einem BF von 1 und variierenden Belichtungszeiten

von 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 6 und 10 sec im bonSAI®-Kleintierscanner. Um die Blutplasmaproben wurden zirkuläre ROIs (entsprechend dem Flüssigkeitsstand in den 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes) gelegt und die absoluten Fluoreszenzintensitäten dieser Bereiche semiquantitativ gemessen.

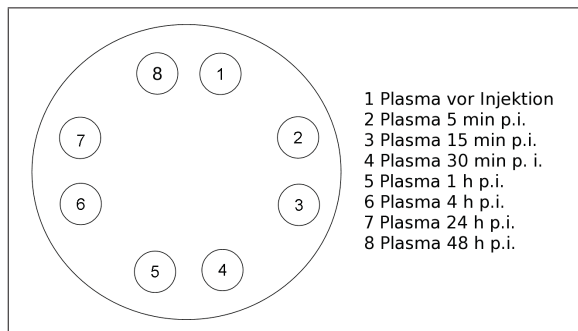


Abbildung 16: Anordnung der Blutplasmaproben auf der Messplatte des Ganzkörper-Nah-Infrarot-Detektors für lebende Kleintiere bonSAI®.

Auch die entnommenen Organe und Tumoren (siehe 4.7.2) wurden unter gleichen Bedingungen im bonSAI®-System vermessen (Anordnung der Proben siehe Abbildung 17). Hierbei wurden Belichtungszeiten von 0,5, 1, 1,5, 2, 3 und 6 sec gewählt. Im Anschluss daran konnten zirkuläre ROIs (der jeweiligen Organ- bzw. Tumorgroße entsprechend) um die jeweilige Messregion gelegt und die absoluten Fluoreszenzintensitäten dieser Bereiche semiquantitativ gemessen werden.

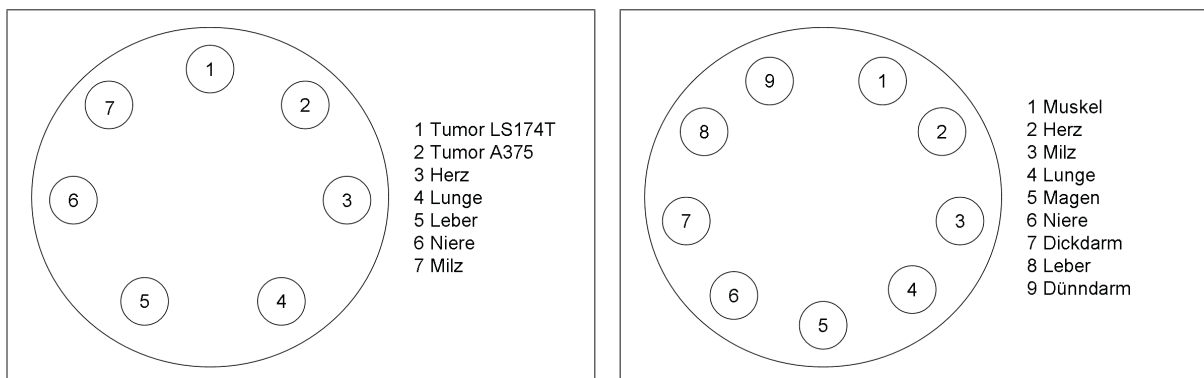


Abbildung 17: Anordnung der Organ- und Gewebeprobe von tumorimplantierten *BALB/c/SCID*-Mäusen (links) und gesunden *NMRI*-Mäusen (rechts) auf der Messplatte des Ganzkörper-Nah-Infrarot-Detektors für lebende Kleintiere bonSAI®.

4.8 Darstellung des Datenmaterials, mathematische Berechnungen und statistische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Zahlenwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Sämtliche Grafiken wurden mit der Statistik- und Grafiksoftware *R 2.11.1* (R Vereinigung für statistisches Rechnen, Wien, Österreich) unter Verwendung der Softwarepakete *gplots* (Warnes et al. 2010) und *lattice* (Grothendieck 2008) erstellt.

Die mittels fluorooptischer Messungen ermittelten Fluoreszenzintensitäten nach Sondeninkubation (*in vitro*-Versuche) bzw. nach Sondeninjektion (*in vivo*- und *ex vivo*-Versuche) wurden ins Verhältnis zu ihren jeweiligen nativen Referenzproben (Negativkontrolle) gesetzt und das Verhältnis als Relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) bezeichnet:

$$\text{RFI} = \frac{\text{Fluoreszenzintensität nach Sondeninkubation/-gabe}}{\text{Negativkontrolle}} \quad (9)$$

Die RFI-Werte geben somit an, um welchen Faktor sich die Fluoreszenz der Messwerte nach Sondeninkubation/-gabe erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle, die der Autofluoreszenz der jeweiligen Probe bzw. des jeweiligen Organs entspricht.

Es musste eine weitere mathematische Vereinfachung durchgeführt werden, um im Zusammenhang der blut- und organkinetischen Versuche die Vergleichbarkeit der drei Sonden untereinander zu gewährleisten. Die RFI-Werte aller Sonden *nach* Sondeninjektion wurden dabei ins Verhältnis zur jeweils injizierten molaren Dy-Menge gesetzt (ergibt Normierte RFI-Werte):

$$RFI_{norm} = \frac{RFI}{Dy-Menge * 10^9} \quad (10)$$

Voraussetzung für diese Normierung war die direkte Proportionalität von Dy-Menge zu Fluoreszenzintensität (wie in 4.2.1 aufgeführt) im Bereich der maximal erreichbaren intravasalen Farbstoffkonzentration (siehe 4.6.4).

Die Prüfung der gemessenen oder errechneten Fluoreszenzwerte erfolgte mittels univariater Varianzanalyse mit Messwiederholungen. Hierbei wurde das Modell mit einem Intra/Inner-Subjekt-Faktor (Faktor ändert sich innerhalb einer Versuchsprüfung bei wiederholten Messungen) und einem Inter/Zwischen-Subjekt-Faktor (Faktor ändert sich zwischen verschiedenen Versuchsprüfungen, z. B. Kontrastmittelart) verwendet (Bender et al. 2007). Als Intra/Inner-Subjekt- bzw. Messwiederholungsfaktor wurde die Belichtungszeit gewählt, denn wie bereits zuvor beschrieben, wurden sämtliche fluorooptische Messungen an ein und derselben Versuchsprüfung bzw. -maus bei verschiedenen Belichtungszeiten unter sonst gleichen Bedingungen (660/735 nm-Filter, BF 1) durchgeführt bzw. "wiederholt". Ob die Belichtungszeit als Messwiederholungsfaktor einen Einfluss auf die Messwerte hatte, konnte nun im Test auf Innersubjekteffekte untersucht werden (Mittelwertvergleich *abhängiger* Stichproben). Als Inter/Zwischen-Subjekt-Faktoren konnten je nach Versuchsaufbau verschiedene Einflussfaktoren gewählt werden. Beispielhaft könnte man hier die Zwischensubjektfaktoren anführen, die auf die fluorooptischen Messungen der Blutproben einen Einfluss nahmen: Die einzelnen Proben unterschieden sich zum einen durch den Entnahmezeitpunkt, zum anderen durch das verwendete/zuvor injizierte Kontrastmittel (siehe 4.6.4). Ob ein signifikanter Einfluss durch die Faktoren Entnahmezeitpunkt und Kontrastmittelart auf die Messwerte im Allgemeinen bestand, konnte nun im Test auf Zwischensubjekteffekte (Mittelwertvergleich *unabhängiger* Stichproben, Globaltest) untersucht werden (Test, ob beispielsweise ein signifikanter Einfluss der Kontrastmittelart auf sämtliche Blutmesswerte zum Entnahmezeitpunkt 5 min besteht). Erhielt man in diesem Test ein signifikantes Ergebnis, so konnte ein Vergleich zwischen den einzelnen Mittelwerten mit Hilfe des post hoc-Bonferroni-Tests (Einzelwertvergleich) durchgeführt werden (Test, ob z. B. ein signifikanter Unterschied zwischen den Blutmesswerten von F(ab)-Dy und IgG-Dy zum Entnahmezeitpunkt 5 min besteht).

Für die Berechnungen wurde die Statistiksoftware *SPSS 17.0* (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Die Signifikanzen wurden textlich als gering im Intervall zwischen $p = 0,05$ und $p = 0,01$, als mittel zwischen $p < 0,01$ und $p = 0,001$ und als hoch bei $p < 0,001$ bezeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Dy-676-Konzentration

Die nach spektrofluorometrischer Vermessung der Dy-676-Verdünnungsreihe erhaltenen Fluoreszenzintensitäten und deren Abhängigkeit von der jeweiligen Dy-676-Konzentration wurden in Abbildung 18A grafisch dargestellt.

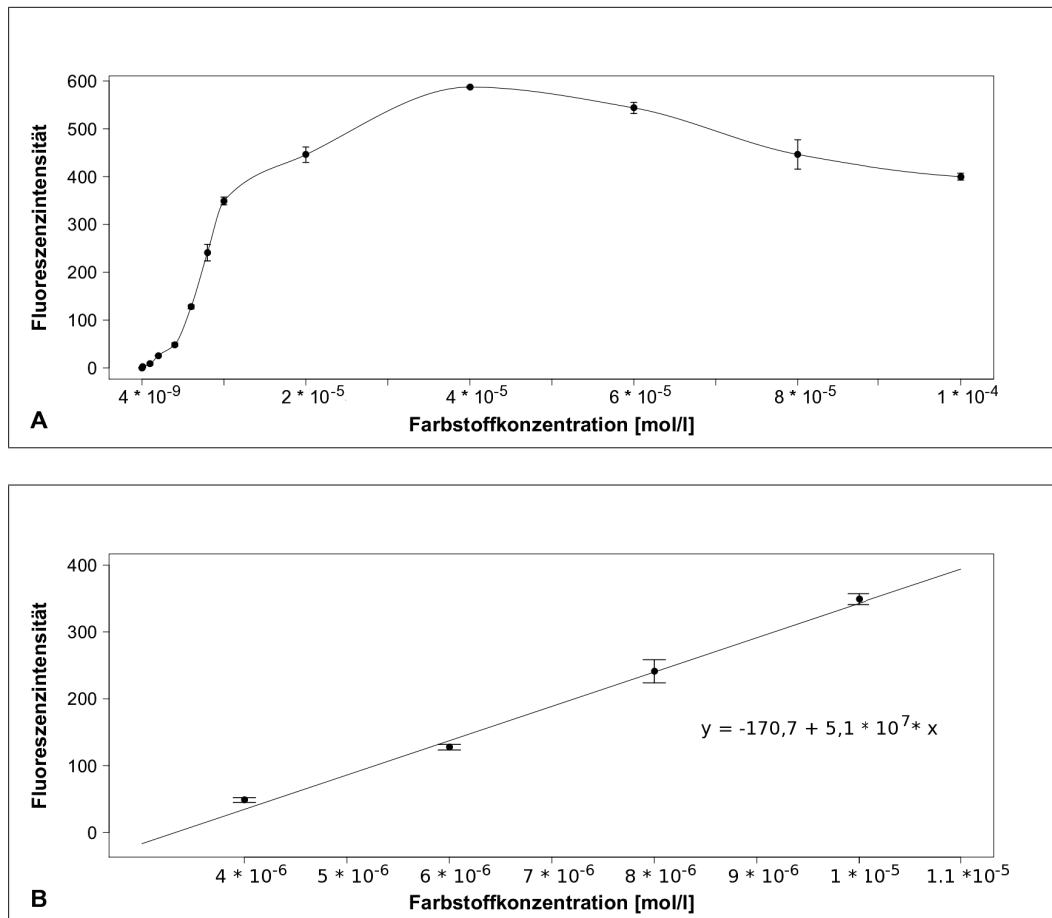


Abbildung 18: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Dy-676-Farbstoffkonzentration. (A) Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration für Farbstoffkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l bis $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. (B) Ausschnitt aus (A), Darstellung des linearen Bereichs von $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l bis $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l mit Regressionslinie und entsprechender Kurvengleichung. Mittelwerte aus 3 Messungen aufgetragen mit Standardfehler.

Dabei war zu erkennen, dass der Graph zwischen den Farbstoff-Verdünnungen $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l und $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l einen linearen Verlauf nahm. Oberhalb dieses Wertes stieg die Fluoreszenzintensität wie zu erwarten exponentiell an, um schließlich wieder abzufallen. Dieser Abfall war bedingt durch den begrenzten Messbereich des Spektrofluorometers *Nanodrop 3300*. Die Fluoreszenzintensitätswerte oberhalb von $1 \cdot 10^{-5}$ waren zu hoch und somit nicht mehr quantifizierbar. Unterhalb von $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l Dy näherte sich die Kurve der Nulllinie an, da die sehr niedrigen Fluoreszenzintensitätswerte durch das Messgerät nicht mehr detektiert werden konnten. Sie lagen ebenfalls außerhalb des Messbereiches.

Der lineare Bereich des Fluoreszenzintensitäts-Konzentrations-Diagrammes wurde zur Veranschaulichung in Abbildung 18B vergrößert dargestellt. Die entsprechende Kurvengleichung wurde eingezeichnet. In Zusammenschau dieser Ergebnisse ergab sich bei Dy-676-Konzentrationen (c_{Dy676}) un-

ter $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l folgende Proportionalität für die Fluoreszenzintensität I_F :

$$I_F \sim 5,13 \cdot 10^7 \cdot c_{Dy676} \quad (11)$$

5.2 Fluorooptische Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden

5.2.1 Antikörperspaltung und Charakteristika der Antikörperfragmente

Für die photometrische Proteinquantifizierung nach Antikörperverdau, -aufreinigung und Pufferaustausch erwiesen sich Eichreihenansätze mit IgG-Konzentrationen von 0 bis 18,18 $\mu\text{g/ml}$ als ideal. Die Eintragung der gemessenen Absorbanzen in das Konzentrations-Absorbanzen-Diagramm ergab eine annähernd lineare Eichkurve mit entsprechender Kurvengleichung (siehe Abbildung 19).

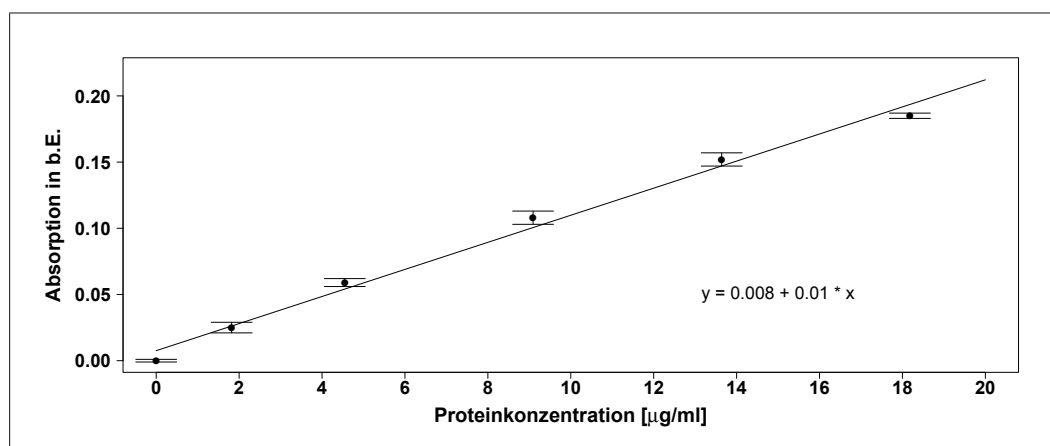


Abbildung 19: Nach spektrophotometrischer Vermessung der IgG-Eichreihe erstellte Eichkurve mit entsprechender Kurvengleichung und Regressionslinie für die Proteinquantifizierung (Mittelwerte aus je 3 Messungen aufgetragen mit Standardfehler). Auf der y-Achse wurden die gemessenen Absorbanzen (Absorption Units), auf der x-Achse die entsprechenden IgG-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] aufgetragen.

Die somit berechneten Proteinmengen der einzelnen, während des Verdaus entstandenen Proteinlösungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Gesamtproteinmengen der verschiedenen Proteinfractionen nach Verdau von je 10 mg Maus- γ -Globulin mit Pepsin bzw. Papain und prozentualer Anteil am eingesetzten Gesamtprotein von 10 mg (Ausbeute). Proteinquantifizierung erfolgte mittels photometrischer Konzentrationsbestimmung.

Verdauvorgang	entstandene Proteinfraction	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute
Papainverdau	Verdaulösung	$3,8 \pm 0,9$	38 %
	F(ab')-Lösung	$2,5 \pm 0,6$	25 %
	Fc-Lösung	$1,2 \pm 0,2$	12 %
Pepsinverdau	Verdaulösung	$3,5 \pm 0,6$	35 %
	F(ab') ₂ -Lösung	$1,7 \pm 0,4$	17 %
	Fc-Subfragment-Lösung	$1,5 \pm 0,5$	15 %

In Abbildung 20 wurden die Proteinmengen des eingesetzten IgGs sowie der entstandenen Proteinfractionen für beide Verdauvorgänge grafisch dargestellt.

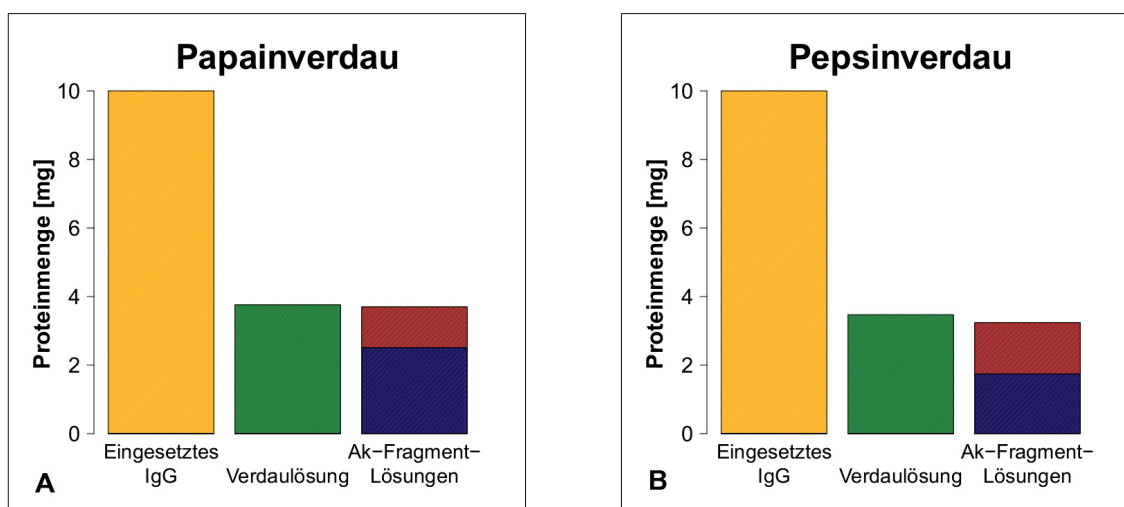


Abbildung 20: Durchschnittliche Proteinmengen während (A) Papainverdau und (B) Pepsinverdau. Dargestellt sind die Mengen an eingesetztem IgG (gelbe Säule), entstandener Verdaulösung (grüne Säule) und den jeweils entstandenen Antikörperfragmentlösungen nach Auftrennung der Verdaulösung (blau-rote Säule, (A) blauer Säulenanteil steht für Menge an F(ab')-Fragmenten, rot für Fc-Fragmente; (B) blauer Säulenanteil steht für Menge an F(ab')₂-Fragmenten, rot für Fc-Subfragmente). Proteinquantifizierung erfolgte mittels photometrischer Konzentrationsbestimmung.

Hierbei wird deutlich, dass sowohl beim Papain- als auch beim Pepsinverdau ein recht starker und etwa gleich großer Proteinverlust zu verzeichnen war. Dieser spiegelt sich vor allem in der Differenz zwischen der Menge des eingesetzten IgG und der entstandenen Verdaulösungen wider (vergleiche die jeweils linke mit der mittleren Säule in Abbildung 20A und B). Beim Papainverdau war hier eine durchschnittliche Reduktion der Proteinmenge um 63,4 % und beim Pepsinverdau um 65,3 % zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu ergaben sich nach Auftrennung der Verdaulösung in die jeweiligen Antikörperspaltprodukte annähernd gleiche Gesamtproteinmengen (vergleiche die jeweils mittlere mit der rechten Säule in Abbildung 20A und B). Somit entstand der größte Proteinverlust im Herstellungsprozeß der Verdaulösung, d. h. während Inkubation des Maus- γ -Globulins mit der jeweiligen Endopeptidase und anschließender Trennung der Verdaulösung vom Enzym-Gel mittels Harz-Separator.

Ein weiterer auffällig hoher Proteinverlust war nach Pufferaustausch der Fc-Fragment-Lösungen zu erkennen. Hier zeigte sich eine Reduktion der Proteinmenge auf 50 % des Ausgangswertes. Der Verlust bei F(ab')- und Fc-Subfragmente-Lösung stellte sich als weitaus geringer dar und lag im Bereich des vom Hersteller angegebenen, zu erwartenden Proteinverlust von etwa 10 % (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Gesamtproteinmengen ausgewählter Proben der Proteinfractionen F(ab'), Fc und Fc-Subfragmente vor und nach Pufferaustausch mittels *iCON™ Concentrators*. Proteinquantifizierung erfolgte mittels photometrischer Konzentrationsbestimmung.

Proteinfraction	Gesamtprotein [mg] vor Pufferaustausch	Gesamtprotein [mg] nach Pufferaustausch	Proteinverlust [%]
F(ab')-Fraktion	0,75	0,65	13,3
Fc-Fraktion	0,28	0,14	50,0
Fc-Subfragment-Fraktion	0,26	0,24	7,7

Mit Hilfe der nachfolgenden Gelelektrophorese (siehe Abbildung 21) konnten die während der Ver-

dauvorgänge entstandenen Proteine identifiziert und der erfolgreiche Antikörperverdau dargestellt werden.

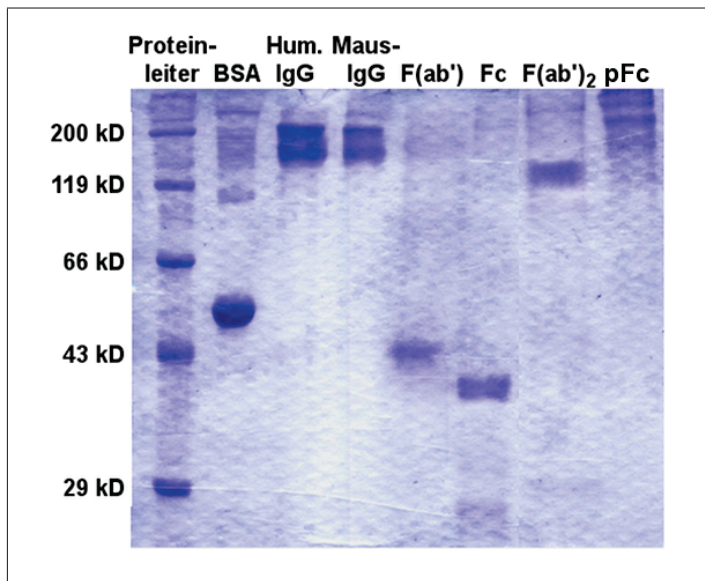


Abbildung 21: „Seminative“ SDS-PAGE (10%iges Trenngel, 4%iges Sammelgel): Proteinproben unter Zusatz von SDS (ohne Mercaptoethanol) aufgetragen. Banden von links nach rechts: Protein-Molekulargewichtsmarker (Proteinleiter), Bovines Serumalbumin (BSA), Humanes Immunglobulin G (Hum. IgG), Maus- γ -Globulin (Maus-IgG), antigenbindendes Fragment [F(ab')], kristallines Fragment (Fc), doppeltes antigenbindendes Fragment [F(ab')₂] und kristalline Subfragmente (pFc).

Humanes Immunglobulin G und Maus- γ -Globulin zeigten deutliche Proteinbanden im Bereich um 150 kDa. Die Proteine der F(ab')-Lösung konnten wie erwartet bei 50 kDa nachgewiesen werden und die Fc-Fragmente stellten sich bei etwa 40 kDa dar. Die Lösung des doppelten antigenbindenden Fragments F(ab')₂ zeigte im 100 kDa-Bereich eine eindeutige Bande. Fc-Subfragmente selbst konnten nicht nachgewiesen werden, es stellten sich jedoch mehrere deutliche Banden im Bereich über 150 kDa dar.

5.2.2 Fluorochromgekoppelte Antikörper und Antikörperfragmente

Die Absorptionsspektren der fluorochromen Sonden zeigten ein Signalrauschen um 280 nm, welches der stark absorbierenden Fähigkeit des Proteins entsprach. Das Absorptionsmaximum lag im Nahinfrarotbereich des Lichtspektrums und entsprach dem Extinktionsmaximum des Dy-676 bei 674 nm. Ein weiteres Absorptionsmaximum stellte sich für alle 4 Sonden im kürzerwelligen Bereich um etwa 630 nm dar. Vor allem für die unspezifischen Sonden IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy erreichte dieser zweite Gipfel im Absorptionsspektrum eine beträchtliche Höhe. Bei Anti-CEA-F(ab')-Dy fiel er etwas geringer aus (siehe Abbildung 22).

Das nach *Mujumdar et al.* ermittelte Farbstoff-Protein-Verhältnis nahm je nach Sonden unterschiedliche Werte an. Für IgG-Dy variierte es zwischen 10 und 13, für F(ab')₂-Dy zwischen 5 und 6, für F(ab')-Dy zwischen 8 und 9 und für antiCEA-Dy (zur Verfügung gestellt von Frau Görmer, AG Experimentelle Radiologie, IDIR Jena) zwischen 8 und 10.

Wie in Tabelle 12 zu erkennen, wurde die Menge des für die Kopplung eingesetzten Farbstoffes im Verhältnis zur jeweils eingesetzten molaren Proteinkonzentration (Verhältnis eingesetzter Farbstoff [mol]/eingesetztes Protein [mol]) während der Sondenherstellung stark verändert. Beispielsweise wurde für die Kopplung einer gewissen Menge an F(ab')-Fragmenten in einem Ansatz eine 72,6 mal und in einem anderen Ansatz nur eine 29,0 mal höhere Dy-Menge verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass das Farbstoff-Protein-Verhältnis der bei diesem Kopplungsvorgang entstandenen und anschließend aufgereinigten F(ab')-Dy-Sonde bei Einsatz einer niedrigeren Dy-Menge einen höheren Wert annahm, während bei Einsatz einer höheren Dy-Menge ein niedrigeres Dy-Protein-Verhältnis

ermittelt wurde. Umgekehrt verhielt es sich beispielsweise bei der Herstellung der IgG-Dy-Sonde.

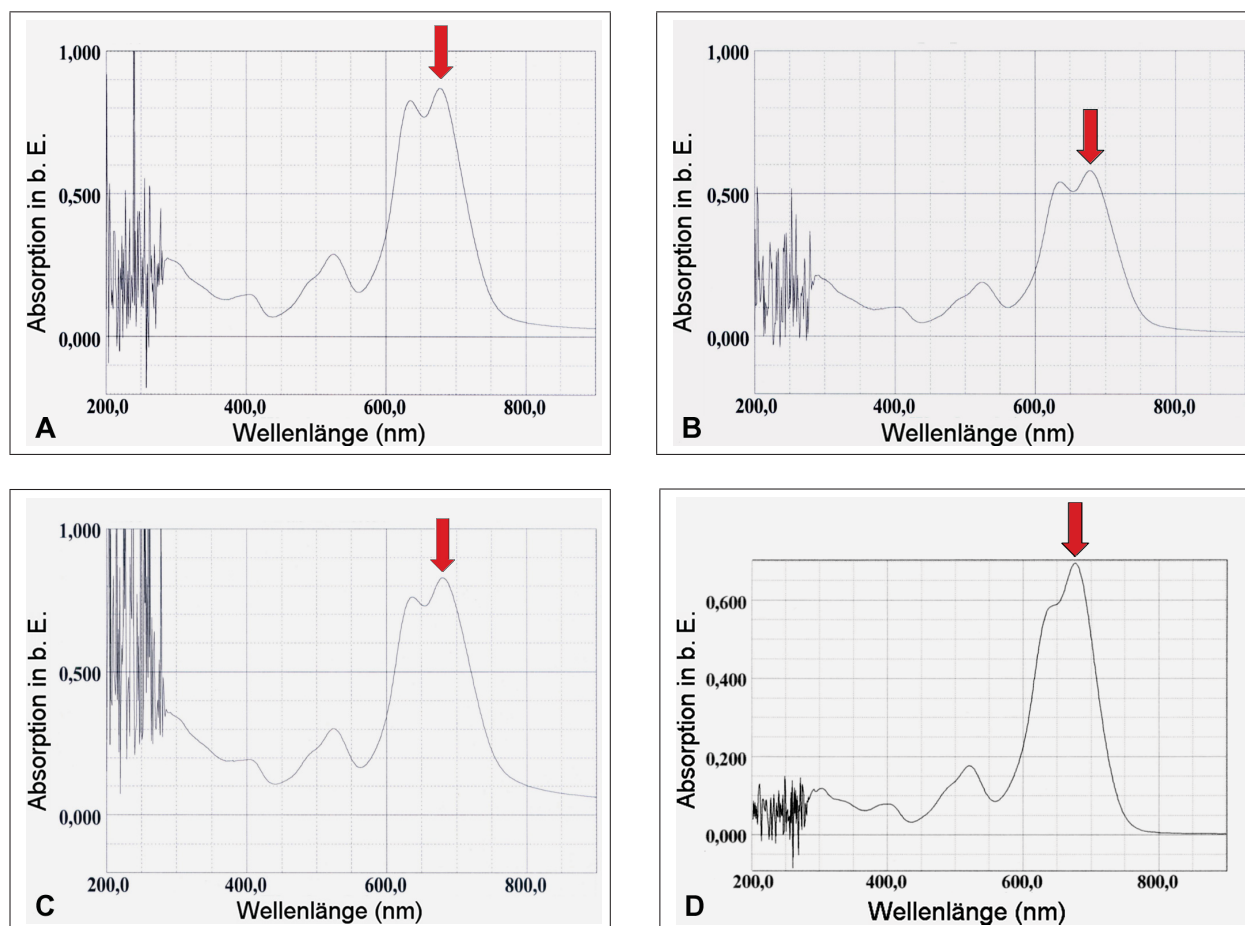


Abbildung 22: Absorptionsspektren der aufgereinigten fluorochromen Sonden. (A) IgG-Dy, (B) F(ab)₂-Dy, (C) F(ab')-Dy, (D) antiCEA-F(ab')-Dy. Bei 280 nm findet sich das Signalrauschen des gelabelten Antikörpers bzw. Antikörperfragments. Bei einer Wellenlänge von 674 nm findet sich das Absorptionsmaximum des fluorochromen Farbstoffes Dy-676 (roter Pfeil).

Tabelle 12: Übersicht über die berechneten Farbstoff(Dy-676)-Protein-Verhältnisse (mittlere Spalte) der hergestellten Sonden (IgG-, F(ab')₂-, F(ab')-Dy-Sonde) nach Kopplung und Aufreinigung sowie der antiCEA-F(ab')-Dy-Sonde (zur Verfügung gestellt von Frau Görmer, AG Experimentelle Radiologie, IDIR Jena) mit jeweils 2 Beispielen. In der rechten Spalte dargestellt ist das Verhältnis aus der Stoffmenge des für die Kopplung eingesetzten Farbstoffes und der Stoffmenge des eingesetzten Proteins.

Probe	Farbstoff-Protein-Verhältnis der hergestellten Sonde	Verhältnis eingesetzter Farbstoff [mol] zu eingesetztem Protein [mol]
IgG-Dy	13,2	60,2
	12,1	30,1
F(ab') ₂ -Dy	5,9	82,7
	5,8	75,5
F(ab')-Dy	8,1	72,6
	9,1	29,0
antiCEA-F(ab')-Dy	7,9	-
	9,8	-

5.2.3 Quantenausbeute des F(ab')-Dy

Die in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Materialforschung und -prüfung ermittelte Quantenausbeute Φ des F(ab')-Dy betrug 0,07. Das Absorptionsmaximum λ_{abs} lag bei 682 nm und das Emissionsmaximum λ_{em} bei 701 nm. Die Quantenausbeute des in Methanol gelösten 9 M Styryl wurde ebenfalls auf 0,07 berechnet.

5.3 Wechselwirkungen der F(ab')-Dy-Sonde mit ausgewählten Tumorzellen

5.3.1 Fluorooptische Analyse

Die mittels Bildgebungssystem *bonSAI*® erstellten Falschfarbenbilder (Bsp. siehe Abbildung 23) der LS174T- und A375-Zellpellets zeigten zwischen beiden Zelltypen erkennbare Unterschiede in der F(ab')-Dy-Zell-Interaktion auf. Gut zu erkennen war eine starke Fluoreszenz der mit F(ab')-Dy inkubierten LS174T-Zellen. Die mit dem gleichen Farbstoff inkubierten A375-Zellen erscheinen hingegen nur schwach und die nativen Zelllinien (ohne Kontrastmittel) kaum fluoreszent.

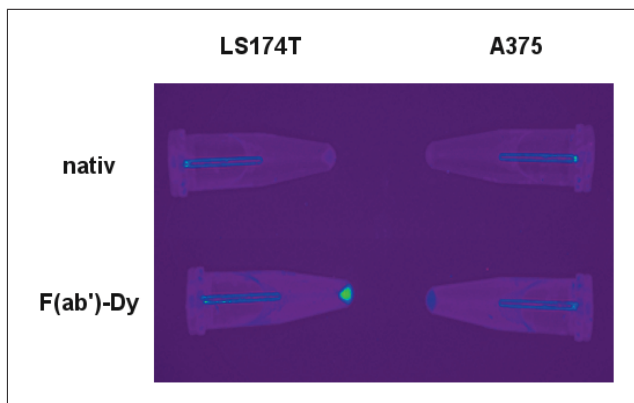


Abbildung 23: Morphologisches NIRF-Falschfarbenbild einer optischen Kleintierscanner-Messung von LS174T- (links) bzw. A375-Zellpellets (rechts) in 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes (Belichtungszeit 1,5 sec, binning factor 1, 660/735 nm-Filter). Oben: native Zellen, unten: nach Inkubation mit unspezifischem F(ab')-Dy. Inkubation von je 1×10^6 Zellen mit je $2,5 \mu\text{g}$ Farbstoff für 1 h bei 4°C in PBS-Tween-Puffer.

Da die mittlere Höhe der Zellpellets 0,3 cm betrug, wurden zirkuläre ROIs mit gleichzähligem Durchmesser (entsprechend einer ROI-Fläche von 293,8 Pixel) für die Auswertung der Falschfarbenbilder herangezogen. Die statistische Analyse der so gewonnenen semiquantitativen Fluoreszenz-Messwerte ($n = 3$) mittels univariater Varianzanalyse mit Messwiederholungen ergab im Test auf Innersubjekteffekte, wie zu erwarten war, einen signifikanten Einfluss der Belichtungszeit auf die Fluoreszenz der Zellen ($p_{A375} = 0,007$, $p_{LS174T} = 0,003$). Es zeigte sich ein exponentielles Ansteigen der mittleren Fluoreszenzintensitäten mit Verlängerung der Belichtungszeit für beide Zelllinien sowohl im nativen als auch im kontrastmittelinkubierten Zustand. Dabei war zu erkennen, dass der Standardfehler mit längerer Belichtungszeit zunahm, die Differenz bzw. Abgrenzbarkeit der Messwerte nativ-kontrastmittelinkubiert jedoch auch (siehe Abbildung 24). In den folgenden Grafiken dieser Arbeit wurden sämtliche Fluoreszenzwerte für eine Belichtungszeit von 1,5 sec dargestellt. Somit wurde ein Kompromiss zwischen Abgrenzbarkeit der Messwerte der Versuchsgruppen untereinander und der Größe des Standardfehlers eingegangen.

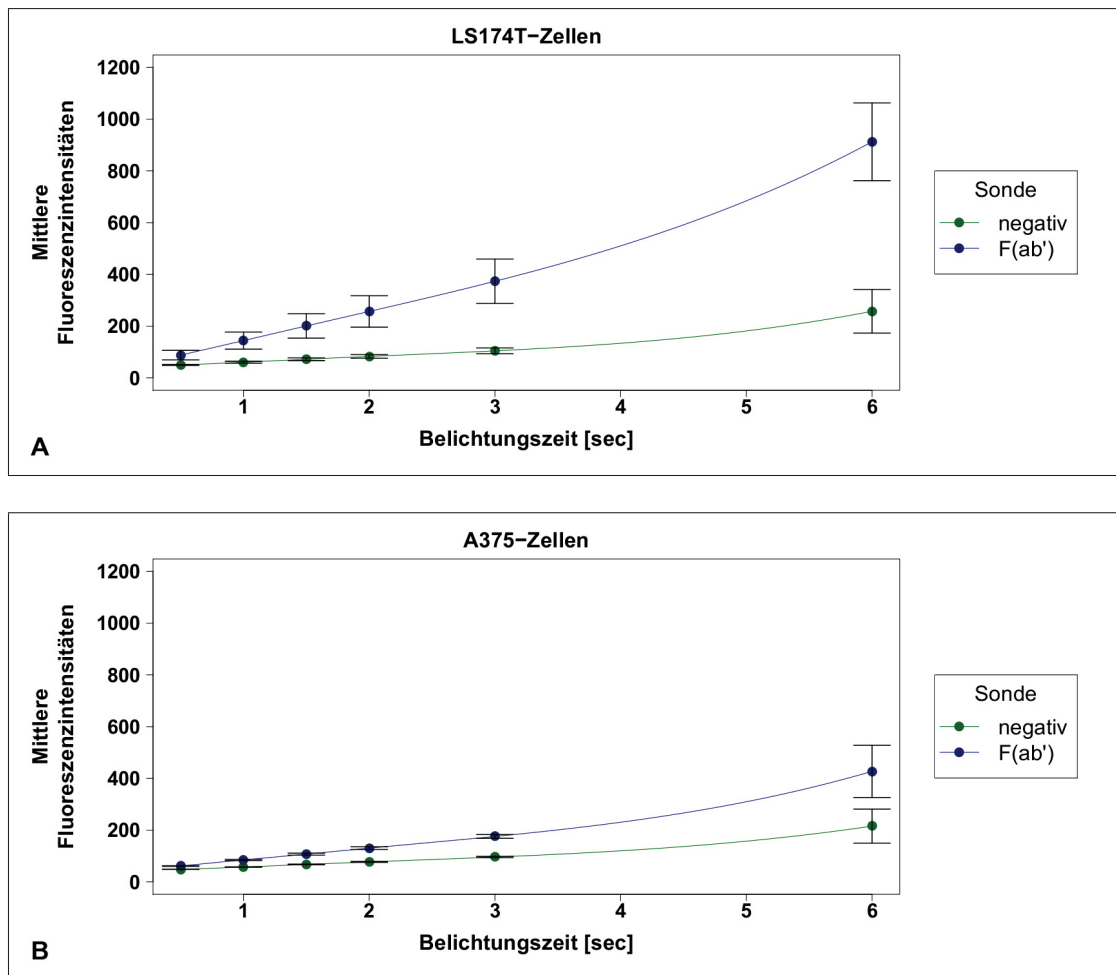


Abbildung 24: Mittlere Fluoreszenzintensitäten von (A) LS174T- und (B) A375-Zellpellets im nativen (grün, "negativ") Zustand sowie nach F(ab')-Dy-Inkubation (blau) bei verschiedenen Belichtungszeiten. Zellpellets vermessen in 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes (binning factor = 1, 660/735 nm-Filter), Mittelwerte aus je 3 Messungen aufgetragen mit Standardfehler. Inkubationsbedingungen siehe Abbildung 23.

Auf die Fluoreszenzintensitäten der nativen Zellproben (ohne F(ab')-Dy-Inkubation) hatte der Zelltyp keinen signifikanten Einfluss, die Autofluoreszenzwerte beider Zelllinien waren annähernd gleich. Bei den kontrastmittelinkubierten Proben spielte der Zelltyp eine gering signifikante Rolle. Hier wiesen die LS174T-Zellen höhere Messwerte auf als die A374-Linie. Sowohl die Fluoreszenzwerte der A375-Zellen als auch der LS174T-Zellen erhöhten sich nach Inkubation mit F(ab')-Dy gering signifikant im Vergleich zu den Nativwerten (Diagramm der mittleren Fluoreszenzintensitäten siehe Abbildung 25A, p-Werte eingetragen).

Die Fluoreszenzintensitäten der F(ab')-Dy-inkubierten Zelllinien wurden ins Verhältnis zu ihren jeweiligen nativen Referenzproben (Negativkontrolle) gesetzt (siehe Abschnitt 4.8, Formel 9). Somit errechnete RFI-Werte wurden sowohl für die LS174T- als auch die A375-Zellpellets in ein Säulendiagramm (siehe Abbildung 25B) aufgetragen. Die statistische Auswertung der Daten mittels univariater Varianzanalyse mit Messwiederholungen zeigte keinen signifikanten Unterschied der RFI-Werte zwischen beiden Zellarten (p-Wert siehe Abbildung 25B).

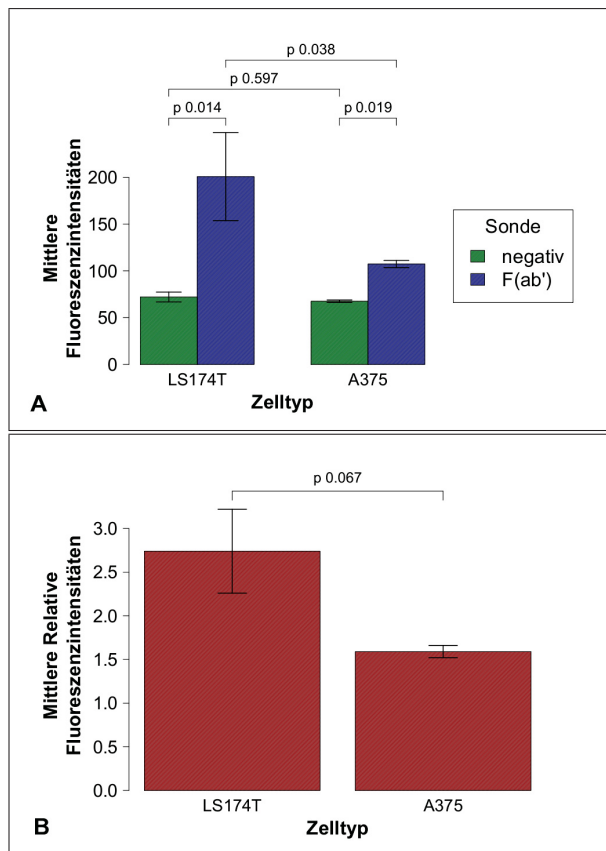


Abbildung 25: (A) Mittlere Fluoreszenzintensitäten von LS174T- (links) bzw. A375-Zellpellets (rechts) im nativen (grün, "negativ") Zustand sowie nach F(ab')-Dy-Inkubation (blau). (B) Mittlere relative Fluoreszenzintensitäten (Verhältnis F(ab')-Dy-inkubiert/leer) von LS174T- (links) bzw. A375-Zellpellets (rechts). Zellpellets vermessen in 1,5 ml-Safe-Lock-Tubes (Belichtungszeit 1,5 sec, binning factor = 1, 660/735 nm-Filter). Abgebildet sind die Mittelwerte aus je 3 Messungen mit zugehörigen Standardfehlern. Die angegebenen p-Werte ermittelt durch univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen zeigen die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den jeweiligen Mittelwerten an. Inkubationsbedingungen siehe Abbildung 23.

5.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Auf den mittels CLSM-Analyse erstellten mikroskopischen Bildern (siehe Abbildung 26) waren die mit DAPI angefärbten, blau fluoreszierenden Kerne der F(ab')-Dy-inkubierten LS174T- und A375-Zellen deutlich erkennbar. Unter Nutzung des 650 nm-Langpassfilters (siehe Abbildung 26B und D) wurde die F(ab')-Dy-Sonde sichtbar gemacht. Sie stellte sich entsprechend ihrer Emissionswellenlänge von 674 nm rötlich dar. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass beide Zelllinien ein gerade noch erkennbares, d. h. sehr schwaches, F(ab')-Dy-Sonden-Signal aufwiesen. Dieses stellte sich überwiegend im Randbereich der Zellen dar.

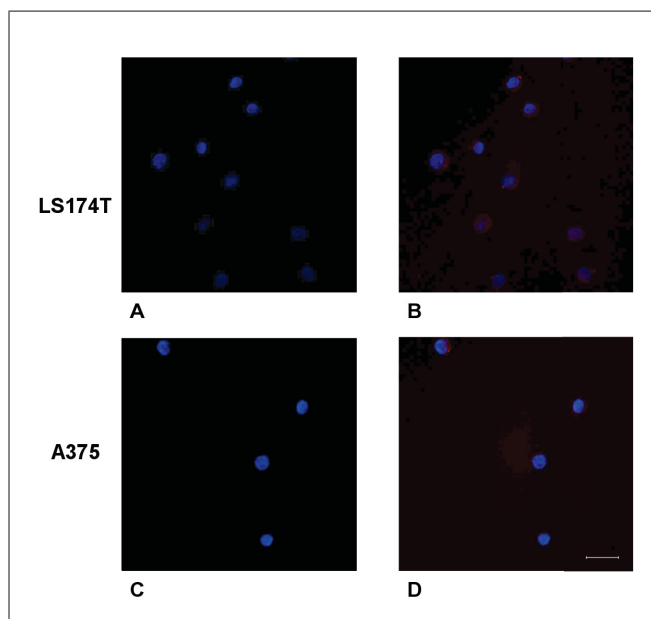


Abbildung 26: Konfokale Laserscannermikroskopie von LS174T- und A375-Zellen nach Inkubation mit F(ab')-Dy aufgenommen mit und ohne 650 nm-Langpassfilter. (A) LS174T-Zellen ohne 650 nm-Filter, (B) LS174T-Zellen mit 650 nm-Filter; (C) A375-Zellen ohne 650 nm-Filter, (D) A375-Zellen mit 650 nm-Filter. Inkubation von je 1×10^6 Zellen mit je $2,5 \mu\text{g}$ Farbstoff für 1 h bei 4°C in PBS-Tween-Puffer. Maßstabsbalken entspricht $20 \mu\text{m}$.

5.4 Kinetik fluorchrom-markierter, unspezifischer F(ab')-Fragmente in ausgewählten Tumoren

Die vor sowie sofort, 2, 4, 8, 16 und 24 h nach Injektion der F(ab')-Dy-Sonde in xenotransplantierte Mäuse mit CEA-negativem A375-Tumor und CEA-positivem LS174T-Tumor erstellten fluorooptischen Kleintierscanner-Aufnahmen sind beispielhaft in Abbildung 27 dargestellt. Ab dem Zeitpunkt 2 h ist in beiden Tumorregionen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz zu erkennen. Dabei fluoresziert der A375-Tumor zu allen Zeitpunkten etwas stärker als der LS174T-Tumor (Übergang der Falschfarbendarstellung vom Blauen ins Grünliche).

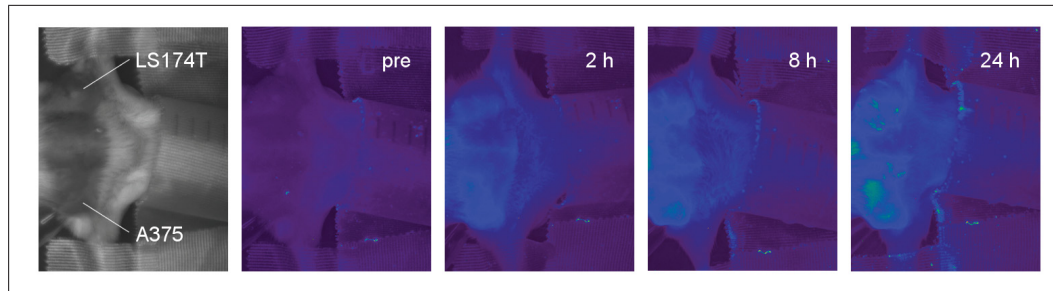


Abbildung 27: NIRF-Optische Kleintierscanner-Aufnahmen Tumor-implantierter BALB/c/SCID-Mäuse vor sowie 2, 8 und 24 h nach i.v.-Injektion von 40 μ g F(ab')-Dy (erstes Bild Lichtbild, weitere Bilder: Belichtungszeit 1,5 sec, binning factor 1, 660/735 nm-Filter).

Der Durchmesser der zur Messung der semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten aller drei Messregionen (LS174T-, A375-Tumor und Muskel) herangezogenen ROIs betrug gemäß der Tumorgroße 0,8 cm (entsprechend einem ROI-Flächeninhalt von 787,5 Pixel).

Die mittels ROI-Auswertung der erstellten Falschfarbenvor *F(ab')-Dy-Injektion* ermittelten semiquantitativen Werte, d. h. die Autofluoreszenzwerte, wurden grafisch in Abbildung 28) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Referenzregion Muskel wie zu erwarten die höchste Autofluoreszenz besitzt. Die Messwerte der Tumorregion A375 liegen darunter, zeigen jedoch eine stärkere Autofluoreszenz als die LS174T-Region.

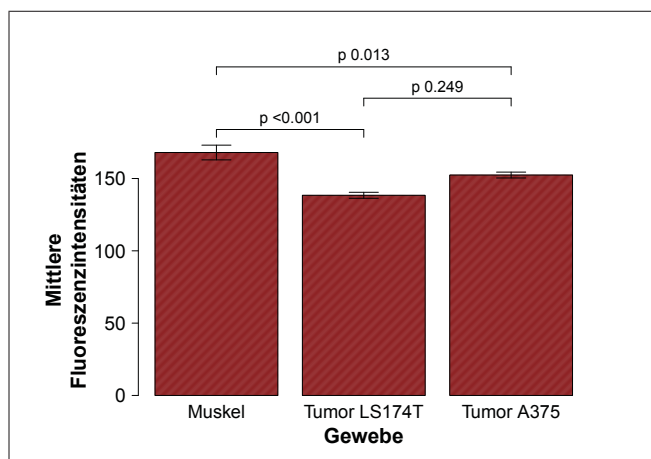


Abbildung 28: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (Autofluoreszenzen) des Referenzgewebes Muskel sowie der A375- und LS174T-Tumoren im nativen Zustand (Belichtungszeit 1,5 sec, binning factor = 1, 660/735 nm-Filter). Abgebildet sind die Mittelwerte aus 5 Messungen mit zugehörigen Standardfehlern. Die angegebenen p-Werte ermittelt durch univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen zeigen die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den jeweiligen Mittelwerten an.

Die Untersuchung des globalen Einflusses der Gewebeart auf die gemessenen Fluoreszenzwerte (univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Test auf Zwischensubjekteffekte) erbrachte ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,001$). Die nähere Analyse mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) zeigte dabei, dass die Autofluoreszenz des Muskels signifikant höher als die der beiden Tumoren ausfiel. Die Tumoren unterschieden sich hinsichtlich ihrer Autofluoreszenz nicht

signifikant (p-Werte aufgetragen in Abbildung 28).

Entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 9 wurden für die einzelnen Messregionen Muskel, A375- und LS174T-Tumor die jeweiligen RFI-Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion berechnet und grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 29). Es ist zu erkennen, dass die A375-Werte nach Kontrastmittelinjektion stets über den LS174T- und Muskelwerten lagen. Beide Tumorarten zeigen nach 8 h das Relative Fluoreszenzmaximum. In der Muskelregion hingegen ist nach 16 h die höchste Relative Fluoreszenz messbar. Auffällig ist der recht starke Abfall zwischen den RFI-Werten nach 8 und 16 h in der LS174T-Region und der darauffolgende sehr langsame Abfall zwischen 16 und 24 h. Außerdem weisen sämtliche Messregionen nach 24 h deutlich höhere RFI-Werte als zum Zeitpunkt vor Kontrastmittelinjektion auf. Beide Tumorregionen haben zu diesem Zeitpunkt eine ähnlich hohe, mehr als 4 fache Fluoreszenzintensitätszunahme im Vergleich zum Autofluoreszenzwert, während die Relative Fluoreszenzintensität der Muskelregion deutlich niedriger ist und lediglich etwa 2,75 beträgt.

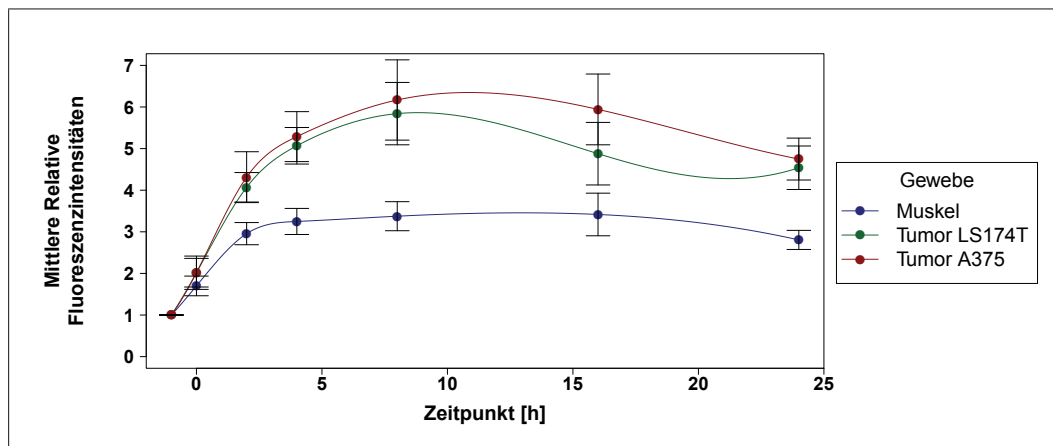


Abbildung 29: Mittlere Relative Fluoreszenzintensitäten der Messregionen Muskel, Tumor LS174T und Tumor A375 vor (-1) sowie sofort (0), 2, 4, 8, 16 und 24 h nach Injektion von 40 μg des F(ab')-Dy (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aus 5 Messungen aufgetragen mit Standardfehler.

Die statistische Auswertung der RFI-Werte mittels univariater Varianzanalyse mit Messwiederholungen zeigte einen lediglich schwach signifikanten globalen Einfluss der Gewebeart auf die errechneten Fluoreszenzwerte zu den Zeitpunkten 2, 4, 8 und 24 h (Test auf Zwischensubjekteffekte). Sofort sowie 16 h nach Injektion der F(ab')-Sonde war der Einfluss nicht signifikant (p-Werte aufgeführt in Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss der Messregion auf die ermittelten RFI-Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Faktor Gewebeart nach Auswertung der Relativen Fluoreszenzintensitäten mittels univariater Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
0 h	0,714
2 h	0,025
4 h	0,015
8 h	0,020
16 h	0,070
24 h	0,014

Eine genauere Untersuchung der signifikanten Zeitpunkte 2, 4, 8 und 24 h mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) erbrachte lediglich nach 2 h signifikante RFI-Wert-Unterschiede zwischen den Messregionen LS174T-Tumor und Muskel. Zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 h blieb die LS174T-Region im marginal nicht signifikanten Differenzbereich zum Muskel. Mit dem A375-Tumor hingegen verhielt es sich umgekehrt. Er zeigte nach 2 h keine signifikante RFI-Differenz zum Referenzgewebe Muskel, wies aber nach 4, 8 und 24 h schwach signifikante Unterschiede zum Muskelgewebe auf. Zwischen den Mittelwerten für RFI_{A375} und RFI_{LS174T} ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Der Einzelwertvergleich zwischen den drei Messregionen Muskel, LS174T- und A375-Tumor wurde in Abbildung 30 grafisch mittels Heatmap (*dt.* Wärmekarte) dargestellt, die zugehörigen p-Werte finden sich in Tabelle 37 im Anhang.

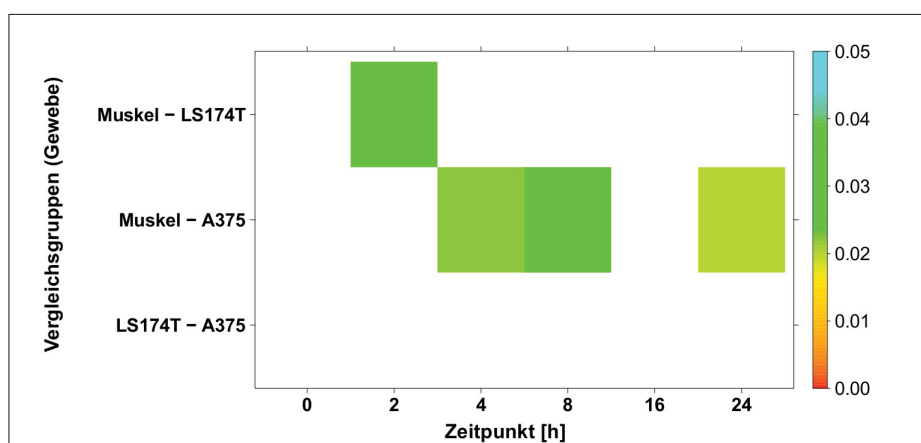


Abbildung 30: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten der Mausgewebe Muskel, LS174T- und A375-Tumor zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion in Form einer Heatmap (*dt.* Wärmekarte). Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 37).

Der Einfluss des Messzeitpunktes (Zeitpunkte der fluorooptischen Messungen vor bzw. nach F(ab')-Dy-Injektion) auf die ermittelten RFI-Werte der drei Messregionen Muskel, LS174T- und A375-Tumor zeigte sich stets hochsignifikant (univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Test auf Zwischensubjekteffekte). Die entsprechend ermittelten p-Werte wurden in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Einfluss des Messzeitpunktes auf die ermittelten RFI-Werte der einzelnen Messregionen (Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Faktor Messzeitpunkt nach Auswertung der Relativen Fluoreszenzintensitäten mittels univariater Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Messregion	p-Wert
Muskel	< 0,001
A375-Tumor	< 0,001
LS174T-Tumor	< 0,001

Beim genaueren Vergleich der ermittelten RFI-Daten zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion mit dem jeweils zugehörigen Nativ-/Autofluoreszenzwert (Bonferroni-Test) ergab sich für keine der drei Messregionen Muskel, LS174T- und A375-Tumor eine signifikante Fluoreszenzerhöhung sofort nach Injektion. Nach 2 h jedoch waren sowohl in der Muskel- als auch in der LS174T-

Region schwach signifikante Fluoreszenzanstiege im Vergleich zum Nativwert zu verzeichnen. Die A375-Region blieb im marginal nicht signifikanten Bereich ($p = 0,066$). 4, 6 und 16 h nach F(ab')-Dy-Injektion konnte in allen drei Messregionen ein hochsignifikanter Anstieg der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Auch 24 h nach Kontrastmittelgabe war noch ein stark signifikanter Unterschied der RFI-Werte der 3 Messgebiete im Vergleich zum Nativwert nachweisbar (siehe Abbildung 31).

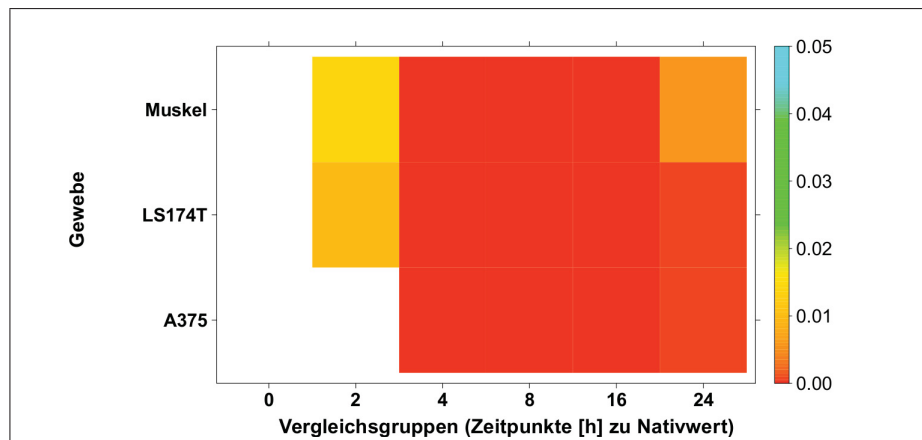


Abbildung 31: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten der Mausgewebe Muskel, LS174T- und A375-Tumor zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion und dem jeweiligen Nativwert in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 37).

Nebenwirkungen oder Unverträglichkeitsreaktionen der Versuchstiere konnten weder im zuvor ausgewerteten noch in den folgenden Experimenten festgestellt werden.

5.5 Biodistribution fluorochrommarkierter, unspezifischer F(ab')-Fragmente in xenotransplantierten *BALB/c/SCID*-Mäusen

Die optischen Kleintierscanner-Aufnahmen der 24 h nach F(ab')-Dy-Applikation aus den xenotransplantierten *BALB/c/SCID*-Mäusen entnommenen Organe und Gewebe wurden beispielhaft in Abbildung 32A dargestellt. Gut zu erkennen war eine starke Sondenanreicherung im Organ Leber (Übergang der Falschfarbendarstellung bis ins Weißliche als Zeichen maximal zu detektierender Fluoreszenzintensität). Sämtliche weiteren Organe und Gewebe inklusive der beiden Tumoren LS174T und A375 wiesen ähnlich schwache Fluoreszenzintensitäten auf (lediglich hellblaue Darstellung). Die Durchmesser der zirkulären ROIs, welche für die Auswertung der Falschfarbenbilder herangezogen wurden, sind in Tabelle 15 für die einzelnen Messobjekte aufgelistet.

Die so gewonnenen semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten (Absolutwerte) wurden grafisch als Säulendiagramm dargestellt (siehe Abbildung 32B). Die Leber zeigte hierbei die mit Abstand höchste Fluoreszenz, die Niere wies die zweitstärkste Fluoreszenz auf und das Herz zeigte die niedrigsten Messwerte.

Der Einfluss der Gewebeart auf die Fluoreszenzmesswerte (univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Test auf Zwischensubjekteffekte) wurde als hochsignifikant eingestuft ($p < 0,001$). Nach genauerer Betrachtung der Werte mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test, p-Werte dargestellt in Abbildung 32B) fiel auf, dass die Leber hochsignifikant höhere Messwerte zeigt als alle anderen

Organe und Gewebe. Im Tumor-Tumor-Vergleich (LS174T zu A375) hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede der Messwerte nachgewiesen werden. Sämtliche weiteren Gewebe wiesen ebenfalls keine signifikanten Messwertdifferenzen untereinander auf.

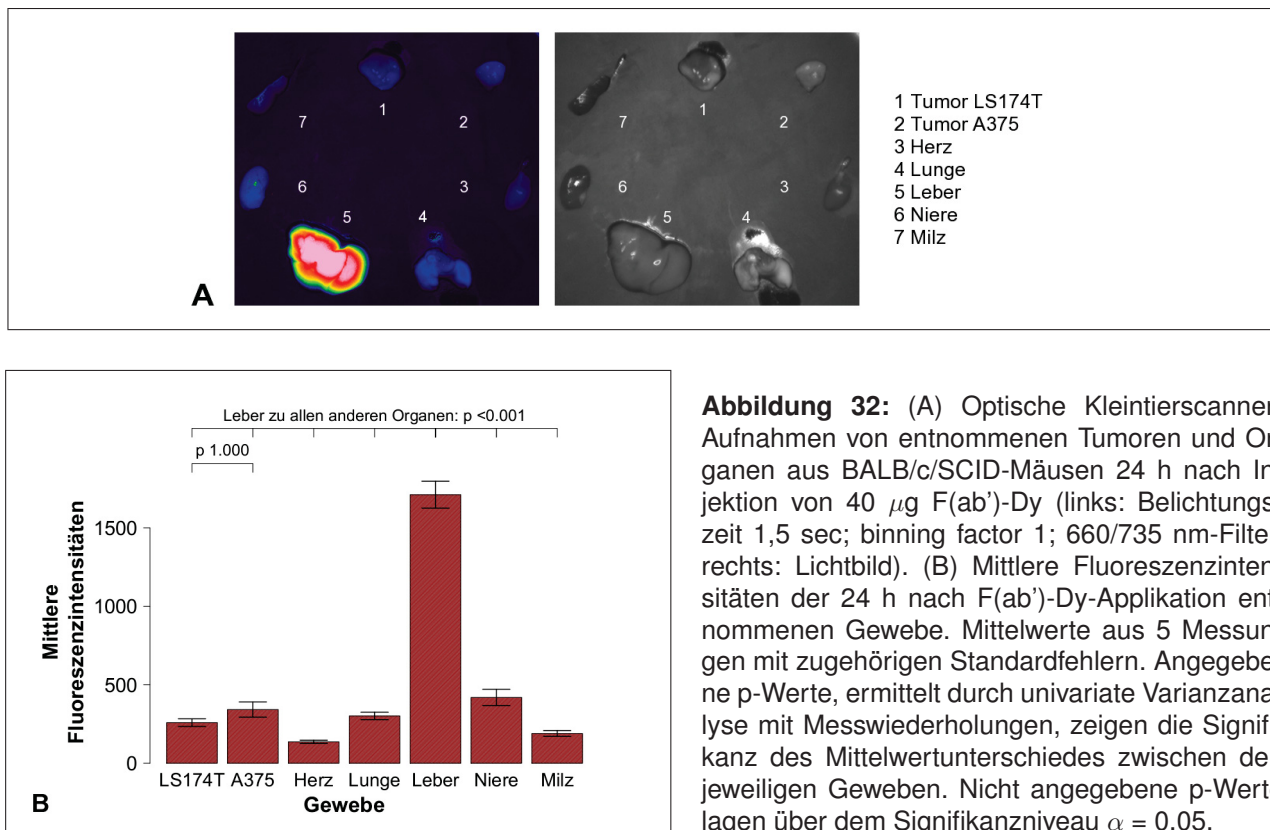


Tabelle 15: Liste der untersuchten Messobjekte mit jeweils zugehörigem Durchmesser der zirkulären ROI sowie der ROI-Fläche in Pixel, die für die Auswertung der optischen Kleintierscanner-Aufnahmen herangezogen wurde.

Messobjekt	ROI-Durchmesser [cm/Pixel]	ROI-Fläche [Pixel]
Tumor LS174T	0,8	787,5
Tumor A375	0,5	493,8
Herz	0,5	493,8
Lunge	0,6	587,5
Leber	1,2	1178,1
Niere	0,5	493,8
Milz	0,3	293,8

5.6 Pharmakokinetik fluorooptischer Antikörper- und Antikörperfragment-Sonden

5.6.1 Blutkinetik

Die optischen Kleintierscanner-Aufnahmen der zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Injektion von IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy-Sonde aus NMRI-Mäusen gewonnenen Plasmaproben wurden am Beispiel des F(ab')₂-Dy in Abbildung 33 dargestellt.

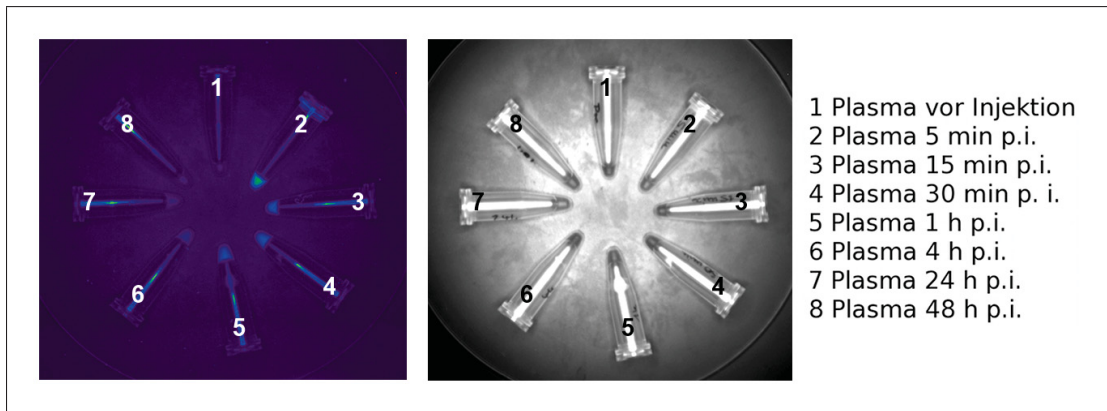


Abbildung 33: Optische Kleintierscanner-Aufnahmen von 20 μl -Plasmaproben in 0,5 ml-Safe-Lock-Tubes, entnommen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Injektion von 8 μg F(ab')_2 -Dy-Sonde in eine NMRI-Maus (links: Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 2; 660/735 nm-Filter, rechts: Lichtbild).

Zur Auswertung der Falschfarbenbilder wurden ROIs mit einem Durchmesser von 0,4 cm (entsprechend einem Kreis von 393,8 Pixel Flächeninhalt) gelegt. Die so bestimmten Fluoreszenzintensitäten der Plasmaproben *nach* Injektion der jeweiligen Sonde wurden entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 9 ins Verhältnis zum Nativ-/Autofluoreszenzwert des Blutes (mittlere Autofluoreszenz = $175,5 \pm 9,2$) gesetzt. Die so ermittelten RFI-Werte wurden in Abbildung 34 grafisch gegen die Zeitpunkte der Blutentnahme aufgetragen.

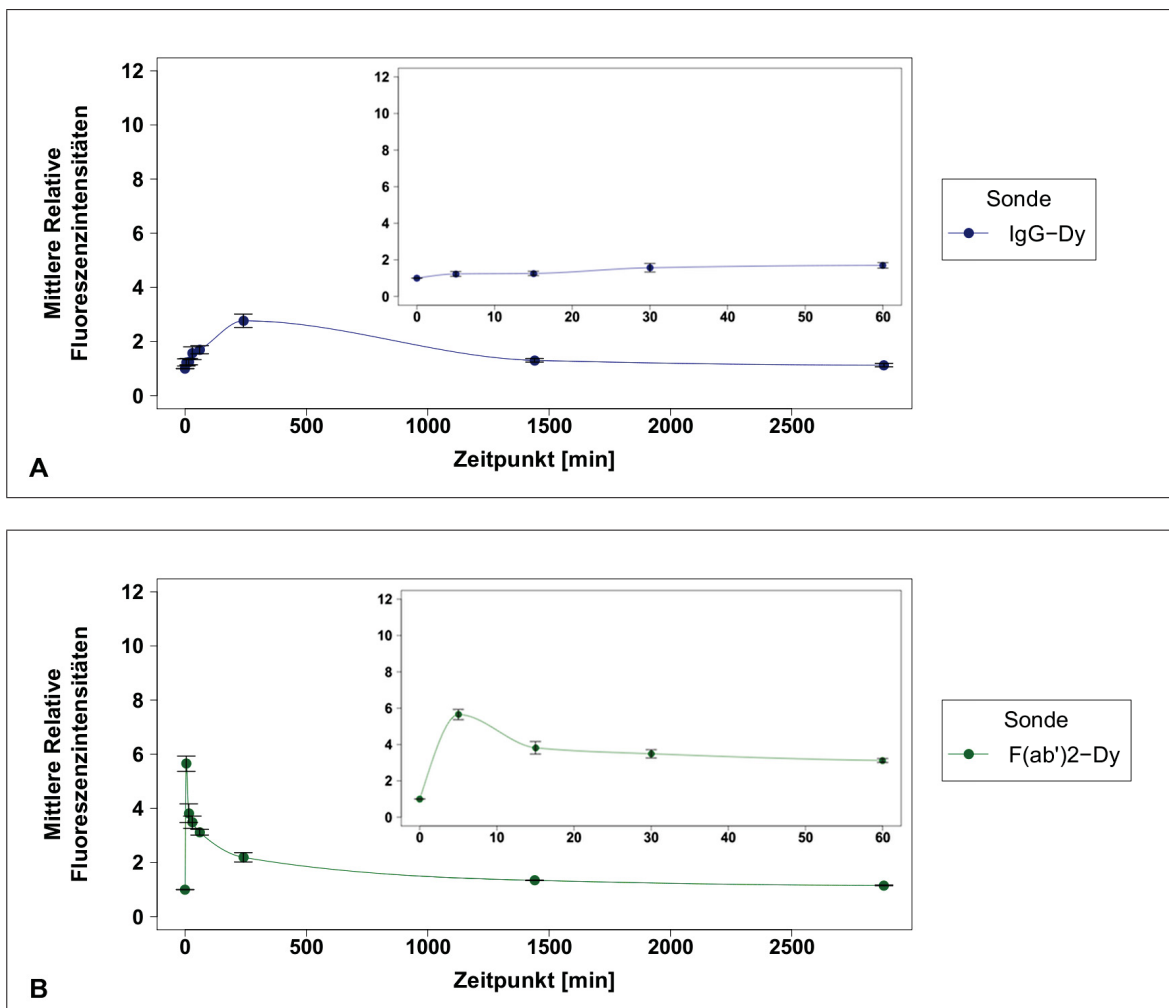


Abbildung 34: Abbildungserklärung siehe nächste Seite

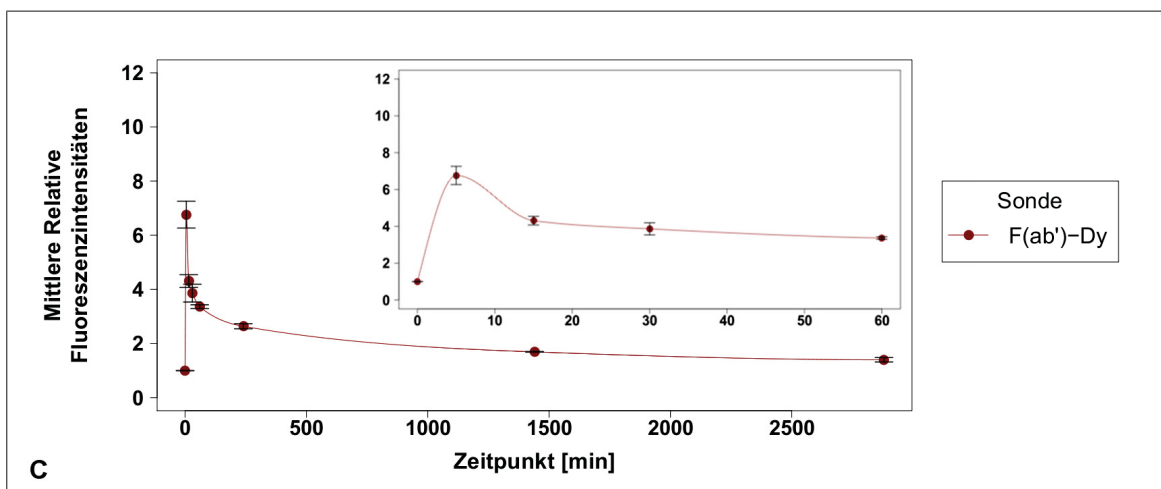


Abbildung 34: Mittlere Relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) von Plasmaproben (5 µl) gesunder NMRI-Mäuse vor sowie 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 24 und 48 h nach Injektion von (A) IgG-Dy, (B) F(ab')₂-Dy und (C) F(ab')-Dy (je 8 µg Protein injiziert). Jeweils eingefügt ist ein Diagrammausschnitt für die Zeitpunkte vor sowie 5 min, 15 min, 30 min und 1 h nach Sondeninjektion. Angegeben ist der Mittelwert aus je 3 Proben mit Standardfehler. Messung der Fluoreszenzintensitäten mittels optischen Kleintierscanner *bonSAI@* (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 2; 660/735 nm-Filter).

Es wird hier sichtbar, dass IgG-Dy zum Zeitpunkt 4 h das Fluoreszenzmaximum erreicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigt die Antikörpersonde einmalig eine höhere Fluoreszenz als F(ab')- und F(ab')₂-Dy. Die Antikörperfragmentsonden fluten weitaus schneller als die komplette Antikörper-Sonde (IgG-Dy) an (Maximum nach 5 min) und erreichen höhere Relativwerte. Dabei liegen die Relativen Fluoreszenzintensitäten des F(ab')₂-Dy zu allen Zeitpunkten unter denen des F(ab')-Dy.

Der Einfluss des Blutentnahme-Zeitpunktes auf die RFI-Werte der Plasmaproben wurde für alle 3 Sonden (IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy) als hochsignifikant eingestuft (univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Test auf Zwischensubjekteffekte, p-Werte siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Einfluss des Blutentnahme-Zeitpunktes auf die ermittelten RFI-Werte der Plasmaproben nach Injektion von 8 µg jeweils einer der drei Sonden IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Faktor Blutentnahme-Zeitpunkt in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Sonde	p-Wert
IgG-Dy	< 0,001
F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
F(ab')-Dy	< 0,001

Nach Vergleich des mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwertes des Blutes mit den jeweiligen RFI-Werten nach Applikation der drei Sonden IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy (Bonferroni-Test) ergaben sich die in Abbildung 35 grafisch dargestellten p-Werte.

Erst 240 min nach IgG-Dy-Injektion zeigten die Plasmaproben signifikant höhere RFI-Werte als die nativen Plasmaproben, während die F(ab')₂- und F(ab')-Dy-Plasmaproben bereits 5 min nach Applikation der Sonde hochsignifikant höhere Werte aufwiesen. 16 und 24 h (1440 min) nach Sondeninjektion waren in keiner der Plasmaproben mehr signifikante Fluoreszenzerhöhungen zu erkennen.

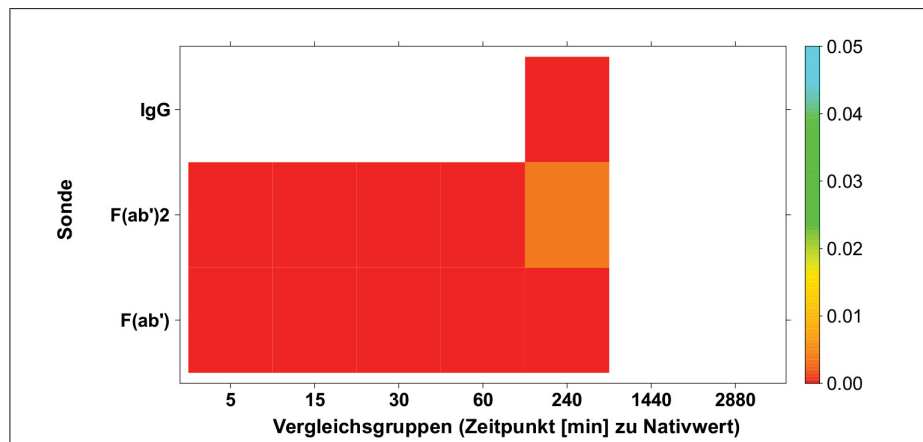


Abbildung 35: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwerte des Blutes und den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten von Plasmaproben gesunder *NMRI*-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 8 μg IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 39).

Da für die drei hergestellten Sonden unterschiedliche Farbstoff-Protein-Verhältnisse errechnet worden waren, musste eine mathematische Vereinfachung durchgeführt werden, um die Vergleichbarkeit der drei Sonden untereinander zu gewährleisten (siehe Abschnitt 4.8, Formel 10). Diese Normierung konnte als sinnvoll erachtet werden, da Dy-Menge und Fluoreszenzintensität wie in Abschnitt 5.1 gezeigt im 10^{-12} bis 10^{-10} molaren Bereich (entspricht der maximal erreichbaren intravasalen Farbstoffkonzentration nach Injektion von je 8 μg der hergestellten IgG-, Fab₂- oder F(ab')-Sonde, siehe 4.6.4.1) direkt proportional zueinander sind. Die somit errechneten Normierten RFI-Werte aller Sonden *nach* Sondeninjektion wurden in Abbildung 36 grafisch gegen die Blutentnahmezeit nach Sondeninjektion dargestellt.

Die Darstellung der Normierten RFI-Werte *vor* Sondengabe (Zeitpunkt 0 min) ist aufgrund rechnerischer Gegebenheiten nicht möglich und an dieser Stelle auch nicht sinnvoll, da die Kurvenverläufe der 3 Sonden *nach* Sondeninjektion verglichen werden sollen.

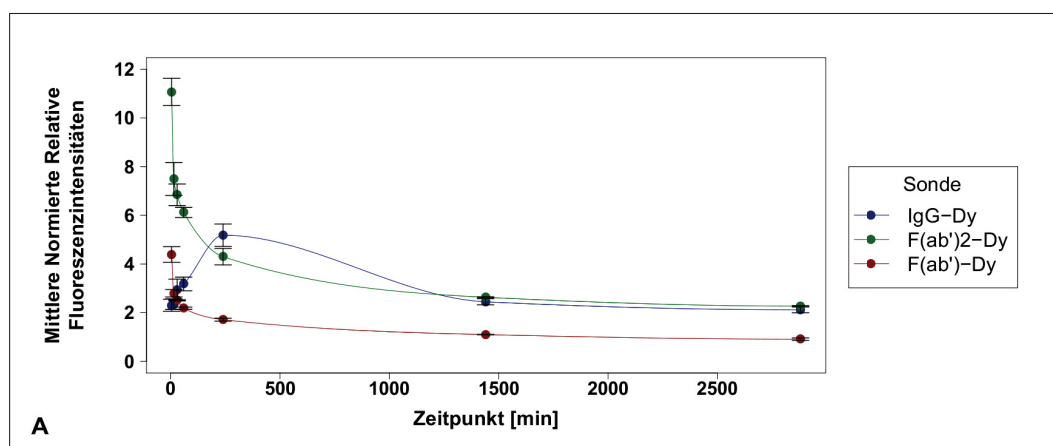


Abbildung 36: Abbildungserklärung siehe nächste Seite

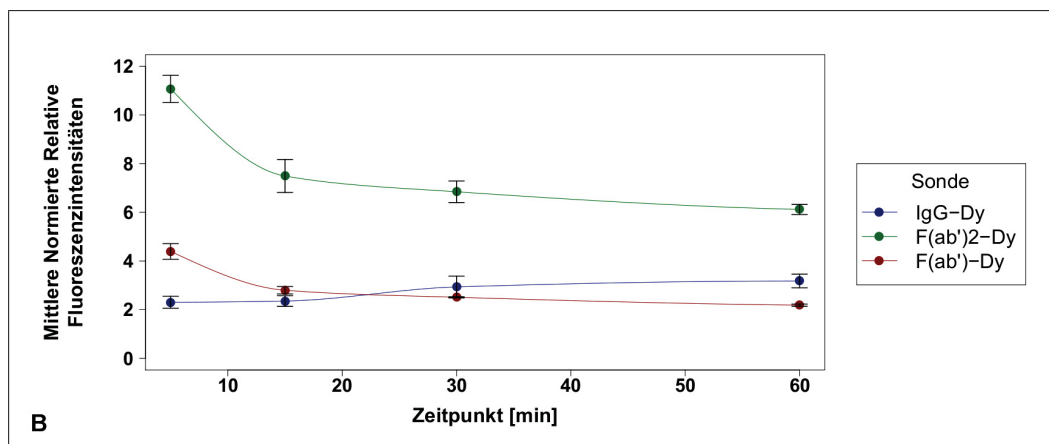


Abbildung 36: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten (RFI_{norm} , semiquantitative Auswertung) von Plasmaproben ($5\ \mu\text{l}$) gesunder *NMRI*-Mäuse (A) 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 24 und 48 h nach Injektion von $F(ab')$, $F(ab')_2$ - bzw. IgG-Dy (je $8\ \mu\text{g}$ Protein injiziert). (B) Ausschnitt aus (A) Für die Zeitpunkte 5 min, 15 min, 30 min und 1 h nach Sondeninjektion. Angegeben ist der Mittelwert aus je 3 Proben mit Standardfehler. Messung der Fluoreszenzintensitäten mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 2; 660/735 nm-Filter).

Die statistische Analyse (univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen) der normierten RFI -Werte ergab einen hochsignifikanten Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) zu fast allen Zeitpunkten der Blutentnahme nach Sondeninjektion (Test auf Zwischensubjekteffekte). 4 h nach Injektion wurde ein stark signifikanter Unterschied zwischen den den RFI_{norm} -Werten der drei Sonden gefunden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten der Blutentnahme nach Injektion von $8\ \mu\text{g}$ Sonde (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Faktor Kontrastmittel in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Zeitpunkt	p-Wert
5 min	< 0,001
15 min	< 0,001
30 min	< 0,001
1 h	< 0,001
4 h	0,001
24 h	< 0,001
48 h	< 0,001

Eine nähere Analyse der normierten RFI -Werte mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) ergab die in Abbildung 37 dargestellten p-Werte.

Gut zu erkennen sind die durchweg mittel- bis hochsignifikanten Unterschiede zwischen den RFI_{norm} -Werten der IgG- und der $F(ab')_2$ -Sonde im Zeitraum von 5 bis 60 min nach Sondeninjektion. Danach näherten sich die Werte der beiden Sonden stark aneinander an, so dass zwischen 4 und 24 h (240 bis 2880 min) keine signifikanten Unterschiede mehr vorhanden waren.

Der Vergleich zwischen IgG- und $F(ab')$ -Dy-Sonde verhielt sich beinahe umgekehrt. Lediglich zum Zeitpunkt 5 min nach Sondeninjektion konnte hier ein mittelsignifikanter Unterschied in den RFI_{norm} -Werten festgestellt werden. Dies war dem schnellen Anfluten der $F(ab')$ -Sonde im Gegensatz zu IgG-Sonde geschuldet (siehe Abbildung 36). 15 und 30 min nach Sondeninjektion jedoch näherten

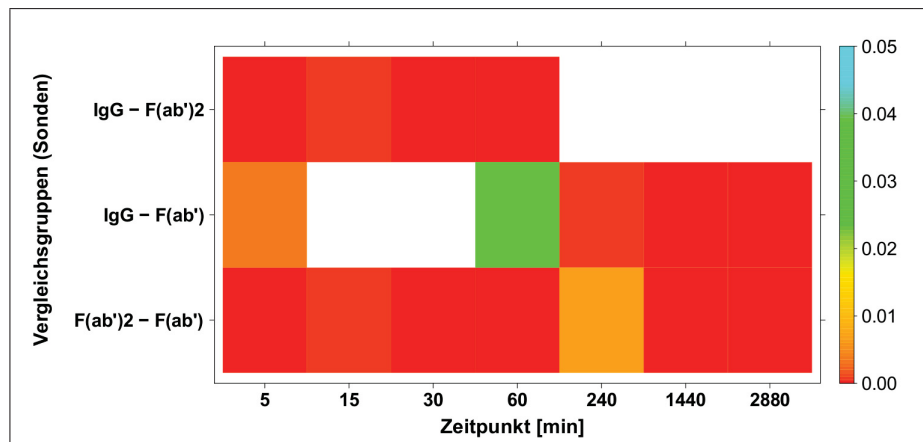


Abbildung 37: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten von Plasmaproben gesunder *NMRI*-Mäuse, dargestellt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 8 μg IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nichtsignifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 40).

sich die Werte beider Sonden stark aneinander an und es konnten keine signifikanten Differenzen der RFI_{norm} -Werte festgestellt werden. Im Zeitraum von 1 bis 24 h (60 bis 2880 min) zeigten sich wiederum zunehmend signifikante Unterschiede in den normierten Fluoreszenzintensitäten beider Sonden.

F(ab')₂- und F(ab')-Dy-Sonde zeigten bei ähnlichem RFI_{norm} -Kurvenverlauf (siehe Abbildung 36) durchweg signifikante Differenzen zwischen den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten. Zu den meisten Messzeitpunkten sind diese Differenzen sogar hochsignifikant und lediglich 15 min sowie 4h (240 min) post injectionem mittelstark signifikant.

5.6.2 Organdistribution

Die optischen Kleintierscanner-Aufnahmen der vor und 1, 6 und 24 h nach Injektion von IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy-Sonde aus *NMRI*-Mäusen gewonnenen Organproben wurden am Beispiel des IgG-Dy in Abbildung 38 dargestellt.

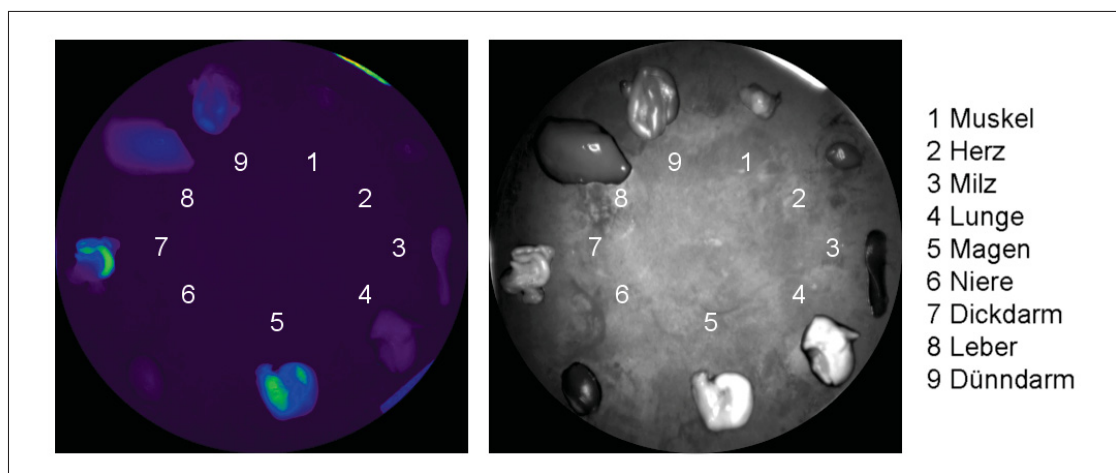


Abbildung 38: Optische Kleintierscanner-Aufnahmen von Organen, 24 h nach Injektion von 50 μg IgG-Dy entnommen aus gesunden *NMRI*-Mäusen (links: Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter, rechts: Lichtbild).

5.6.2.1 Autofluoreszenzen der Organe

Durchmesser und Flächeninhalt der zur Messung der semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten herangezogenen ROIs wurden den einzelnen Organen zugeordnet in Tabelle 18 aufgeführt.

Die Nativ-/Autofluoreszenzwerte wurden in Abbildung 39 grafisch in ein Säulendiagramm aufgetragen. Zu erkennen war hierbei, dass das Verdauungsorgan Magen den höchsten Autofluoreszenzwert aufweist. Die Streuung der Werte ist hier jedoch auch am breitesten. Die niedrigste Fluoreszenzintensität zeigt die nativ gemessene Milz.

Tabelle 18: Liste der untersuchten Mausorgane mit jeweils zugehörigem Durchmesser der zirkulären ROI sowie der ROI-Fläche in Pixel, die für die Auswertung der optischen Kleintierscanner-Aufnahmen herangezogen wurde.

Mausorgan	ROI-Durchmesser [cm]	ROI-Fläche [Pixel]
Muskel	0,5	493,8
Herz	0,5	493,8
Milz	0,3	293,8
Lunge	0,6	587,5
Magen	0,9	883,6
Niere	0,5	493,8
Dickdarm	0,2	196,4
Leber	1,2	1178,1
Dünndarm	0,2	196,4

Der Einfluss der Organart auf die Autofluoreszenzmesswerte wurde als hochsignifikant eingestuft ($p < 0,001$, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, Test auf Zwichensubjekteffekte). Im genaueren Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) zeigten sich signifikant höhere Autofluoreszenzen des Magens im Vergleich zu den Fluoreszenzintensitäten des nativen Referenzgewebes Muskel. Herz, Lunge, Milz, Dünndarm, Leber und Niere weisen stark ähnliche Werte auf. Der Dickdarm unterscheidet sich stärker, jedoch ebenfalls nicht signifikant vom Muskel (p -Werte des Einzelwertvergleiches eingetragen in Abbildung 39).

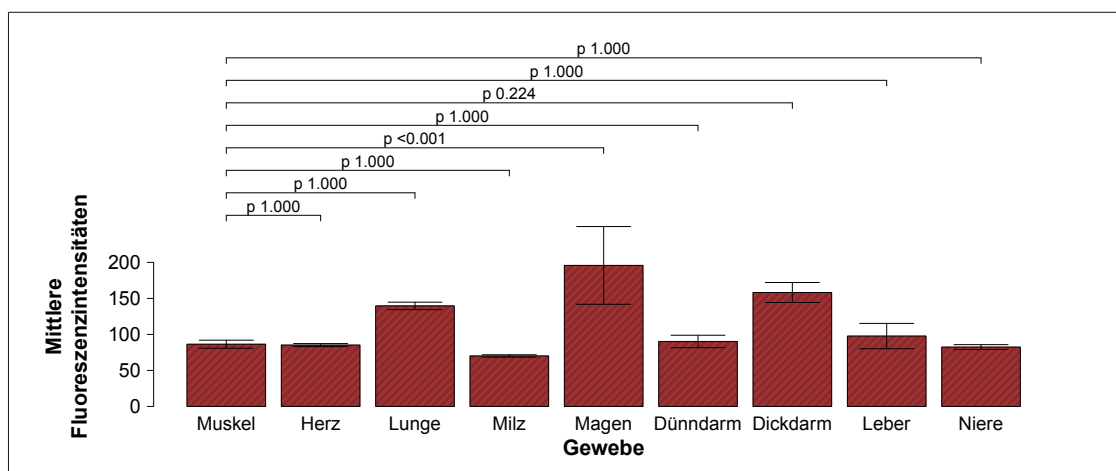


Abbildung 39: Mittlere Fluoreszenzintensitäten ($n = 3$, semiquantitative Auswertung) der vollständigen entnommenen Organe vor (pre) Injektion des Farbstoffs F(ab')-Dy (je $50 \mu\text{g}$ Protein injiziert) in je 3 *NMRI*-Mäuse. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

5.6.2.2 IgG-Dy

Entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 9 wurden die Nativwerte sowie die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Organe zu den verschiedenen Zeitpunkten *nach* IgG-Dy-Injektion ins Verhältnis zu ihrem jeweiligen mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert gesetzt. Somit erhaltene RFI-Werte wurden grafisch gegen die Organentnahmezeit aufgetragen und die Kurven in die funktionell zusammenhängende Organgruppen Eliminationsorgane (Leber und Niere), muskuläre Organe (Herz und Muskel), Lunge und Milz sowie Verdauungsorgane (Magen, Dünn- und Dickdarm) aufgeteilt (siehe Abbildung 40).

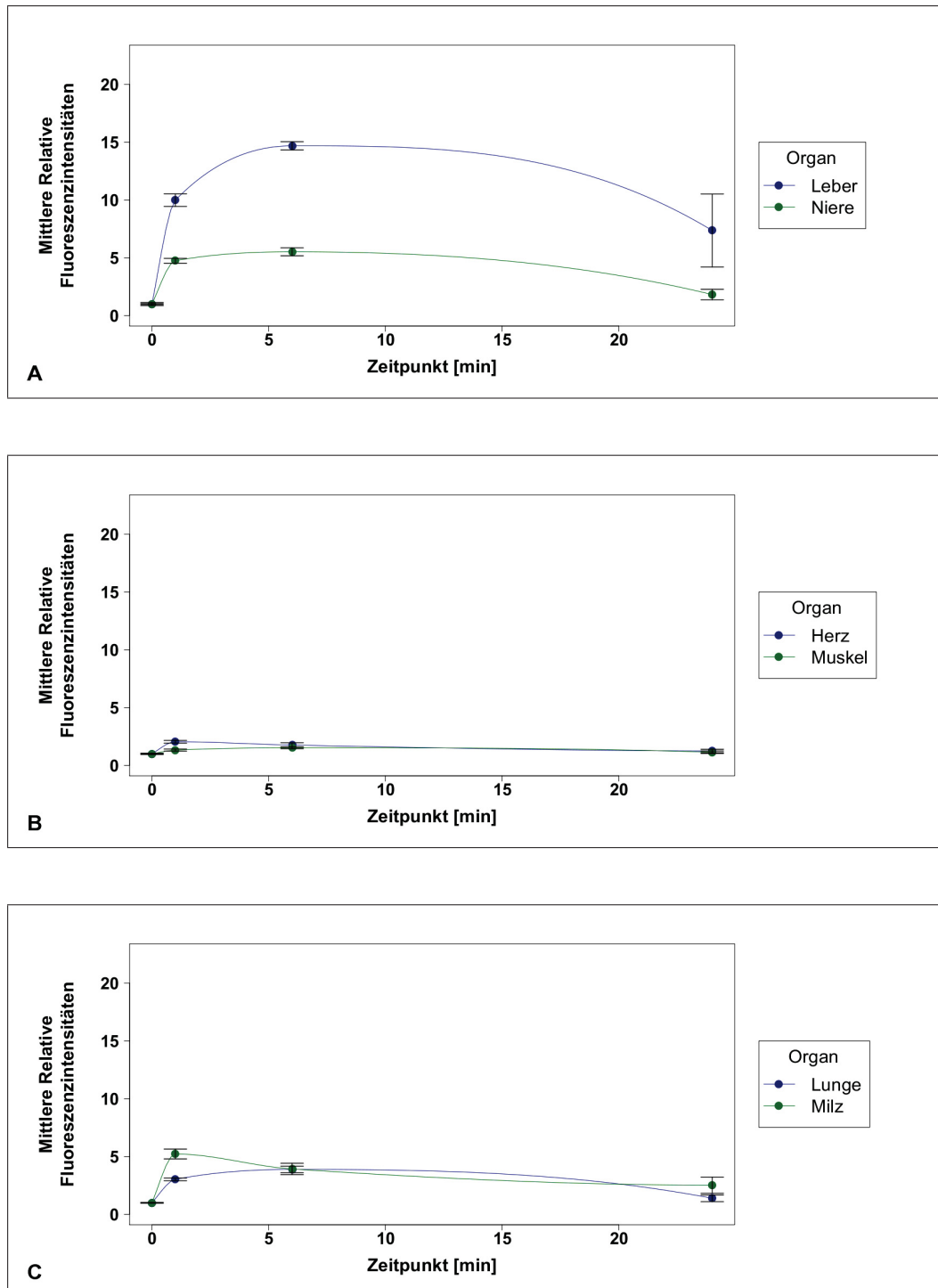


Abbildung 40: Abbildungserklärung siehe nächste Seite

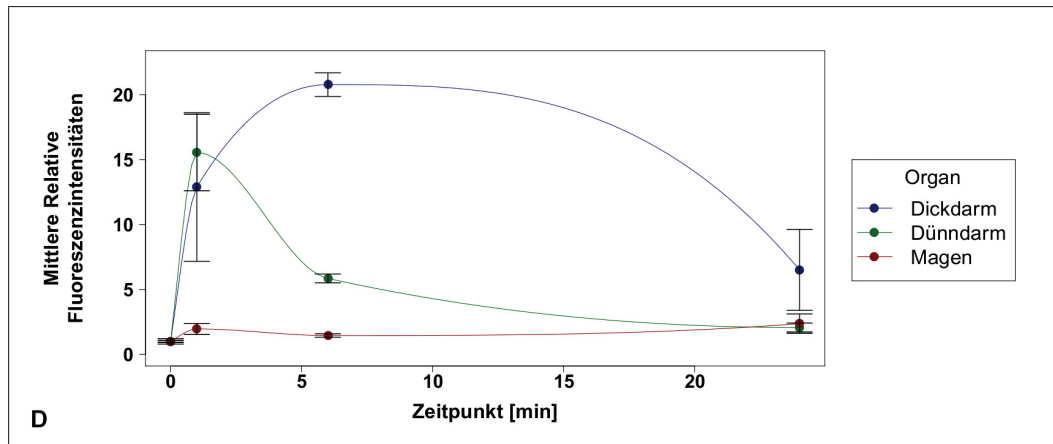


Abbildung 40: Mittlere Relative Fluoreszenzintensitäten der vollständigen entnommenen Organe vor (0 h) sowie 1, 6 und 24 h nach Injektion des Farbstoffs IgG-Dy (je 50 μ g Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zu nativen Organen. In Gruppen dargestellt wurden (A) die Eliminationsorgane Leber und Niere, (B) die Muskulären Organe Muskel und Herz, (C) die Organe Lunge und Milz und (D) die Verdauungsorgane Magen, Dünndarm und Dickdarm. Werte gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Die Verlaufskurven der Organe Lunge, Dickdarm, Leber und Niere erschienen nach Injektion von IgG-Dy vergleichbar. Das Fluoreszenzmaximum zeigte sich hier nach 6 h (siehe auch Abschnitt 5.6.2.5, Abbildungen 49, 51, 57 und 65). Der Magen nahm mit dem Fluoreszenzmaximum zum Zeitpunkt 24 h eine Sonderstellung ein. Auch konnte bei keinem weiteren Organ ein Verlauf gefunden werden, bei dem nach Abfallen der Fluoreszenzintensitäten (Zeitpunkt 6 h) ein erneuter Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt (24 h) erfolgte (siehe auch Abbildung 61). Das Organ mit dem höchsten mittleren RFI-Maximum war der Dickdarm. Jedoch fiel hier bei genauer Betrachtung eine recht große Varianz der RFI-Werte - besonders zum Zeitpunkt 1 h nach Kontrastmittelinjektion - auf. Der Dünndarm zeigte die zweitstärkste und die Leber, deren RFI-Varianz zum Zeitpunkt 24 h nach IgG-Dy-Injektion ebenfalls recht groß war, die drittstärkste Relative Fluoreszenzintensität. Schwach fluoreszente Organe nach IgG-Dy-Injektion waren Muskel, Herz und Magen. Lunge, Milz und Niere lagen im mittleren Bereich (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Mittlere Relative Fluoreszenzmaxima der verschiedenen Organe und Zeitpunkt der Messung des Maximums nach IgG-Dy-Injektion (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter).

Organ	Mittleres Relatives Fluoreszenzmaximum	Zeitpunkt des Maximums [h]
Leber	14,68 \pm 0,36	6
Niere	5,52 \pm 0,35	6
Muskel	1,53 \pm 0,08	6
Herz	2,05 \pm 0,12	1
Lunge	3,89 \pm 0,28	6
Milz	5,22 \pm 0,42	1
Magen	2,36 \pm 0,75	24
Dünndarm	15,55 \pm 2,94	1
Dickdarm	20,78 \pm 0,91	6

Der Einfluss der Organart auf die RFI-Werte nach IgG-Dy-Injektion konnte nach statistischer Analyse zu allen Organentnahmezeitpunkten als signifikant eingestuft werden (univariate Varianzanalyse mit

Messwiederholungen, Test auf Zwischensubjekteffekte). Dabei unterschieden sich die Werte der zwischen den einzelnen Organen nach 1 und 6 h stark, nach 24 h jedoch nur noch schwach voneinander (siehe p-Wert-Tabelle 20).

Tabelle 20: Einfluss der Organart auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von 50 μg IgG-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,001
6	< 0,001
24	0,047

Nach genauerer Analyse der mittleren RFI-Werte sämtlicher Organe durch Einzelwertvergleich mit den mittleren RFI-Werten des Referenzgewebes Muskel zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IgG-Dy-Injektion (Bonferroni-Test), ergaben sich die in Abbildung 41 grafisch dargestellten p-Werte.

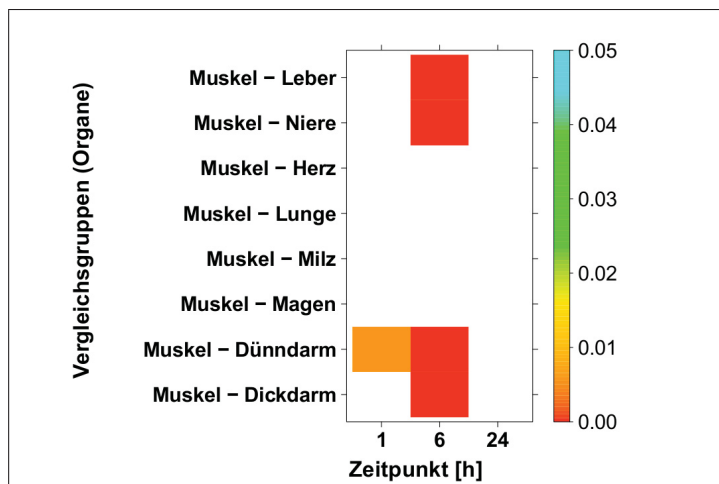


Abbildung 41: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem mittleren Relativen Fluoreszenzwert des Muskels und den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten von weiteren Organproben gesunder NMRI-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 50 μg IgG-Dy in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 41).

1 h nach Sondenapplikation unterschied sich lediglich die Fluoreszenz des Dünndarms gering signifikant von der des Referenzgewebes Muskel. Nach 6 h jedoch, waren signifikante Fluoreszenzerhöhungen auch in den Organen Leber, Niere und Dickdarm nachweisbar. 24 h nach Sondeninjektion näherten sich sämtliche Organe bezüglich ihrer Fluoreszenz so stark an die Fluoreszenz des Muskels an, dass keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar waren.

Betrachtete man den Einfluss des Zeitpunktes der Organentnahme (entspricht Messzeitpunkt) auf die RFI-Werte, so ergab sich für alle Organe mit Ausnahme des Magens ein signifikanter Zusammenhang. Zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IgG-Dy-Injektion wurden somit für fast alle Organe sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten gemessen (siehe p-Wert-Tabelle 21).

Tabelle 21: Einfluss des Zeitpunktes der Organentnahme auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben nach Injektion von 50 μg IgG-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Organ	p-Wert
Leber	0,002
Niere	< 0,001

Tabelle 21: Fortsetzung

Organ	p-Wert
Muskel	0,018
Herz	0,003
Lunge	< 0,001
Milz	0,004
Magen	0,232
Dünndarm	0,001
Dickdarm	0,010

Im genaueren Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) der Relativen Organfluoreszenzintensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IgG-Dy-Injektion mit dem Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert des jeweils gleichen Organs wurden die in Abbildung 42 dargestellten p-Werte ermittelt. Die Werte des Magens wiesen hierbei zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz zum Nativwert auf, d. h. der oben bereits erwähnte fehlende Einfluss des Organentnahmezeitpunktes auf die Fluoreszenzwerte konnte bestätigt werden. Sämtliche Organe zeigten nach 24 h bereits ähnliche Werte wie vor IgG-Dy-Injektion (keine Signifikanz).

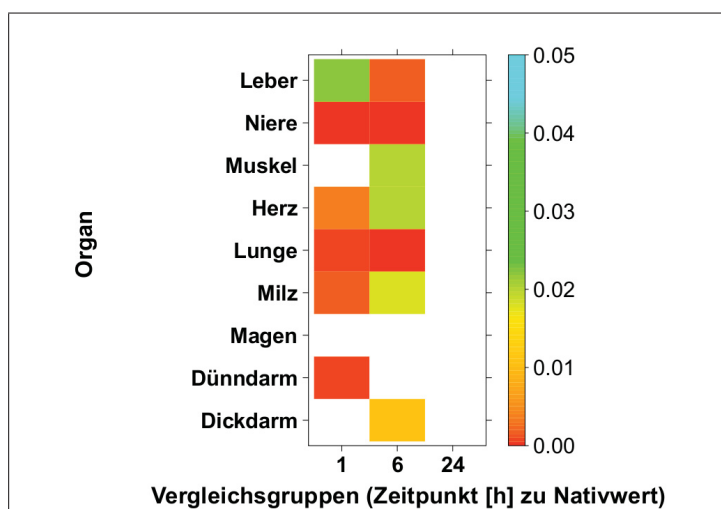


Abbildung 42: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert der einzelnen Organe und den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 50 µg IgG-Dy in NMRI-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 42).

5.6.2.3 F(ab')₂-Dy

Entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 9 wurden auch für die Organfluoreszenzen nach F(ab')₂-Dy-Injektion die RFI-Werte ermittelt und im RFI-Organentnahmezeit-Diagramm (siehe Abbildung 43) aufgetragen. Hier ist erkennbar, dass die Verlaufskurven beinahe aller Organe bereits nach 1 h ihr Relatives Fluoreszenzmaximum erreichen und bis zum Zeitpunkt 6 h stark abfallen. Lediglich die Organe Magen und Dünndarm zeigen erst 6 h nach Applikation des F(ab')₂-Dys die stärkste Fluoreszenz (siehe auch Abschnitt 5.6.2.5, Abbildung 61 und 63). Die höchste mittlere Relative Fluoreszenzintensität nach F(ab')₂-Dy-Injektion wies der Dickdarm auf. Es folgte die Niere. Sehr schwach fluoreszent waren Muskel, Herz und Magen. Im gleichen Bereich lagen auch Lunge und Milz. Leber und Dünndarm erreichten nach F(ab')₂-Dy-Gabe mittelstarke RFI-Werte (siehe Tabelle 22).

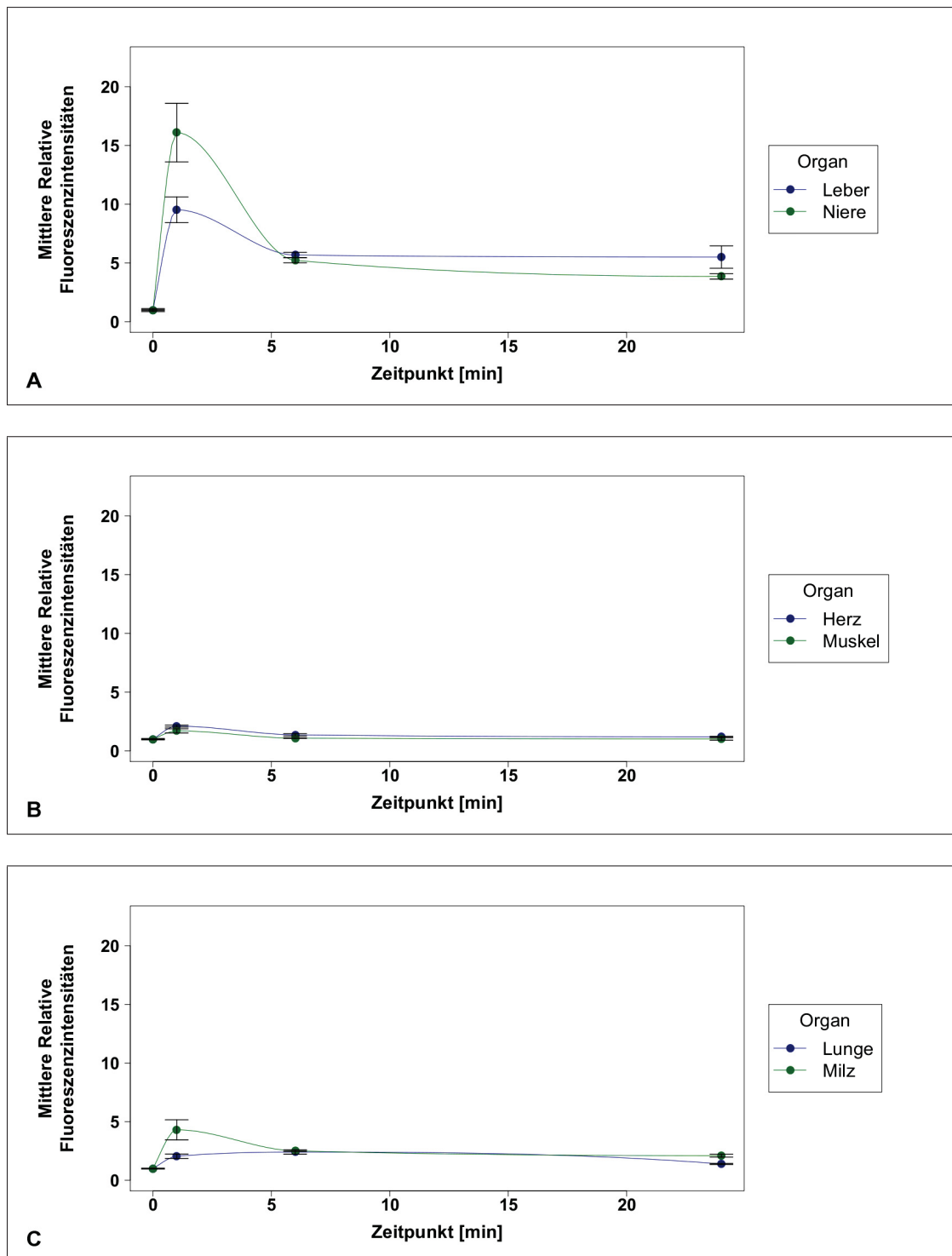


Abbildung 43: Abbildungserklärung siehe nächste Seite

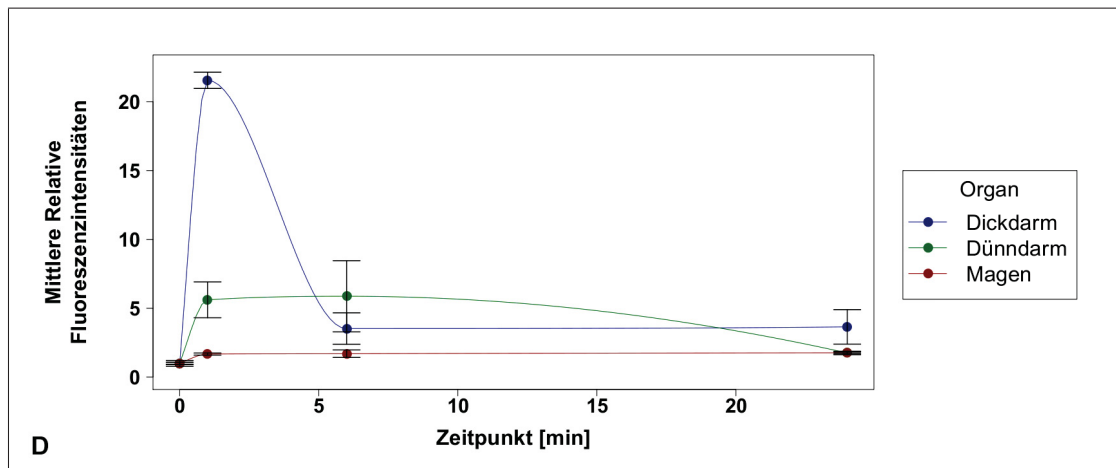


Abbildung 43: Mittlere Relative Fluoreszenzintensitäten der vollständigen entnommenen Organe vor (0 h) sowie 1, 6 und 24 h nach Injektion des Farbstoffs F(ab')₂-Dy (je 25 µg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zu nativen Organen. In Gruppen dargestellt wurden (A) die Eliminationsorgane Leber und Niere, (B) die Muskulären Organe Muskel und Herz, (C) die Organe Lunge und Milz und (D) die Verdauungsorgane Magen, Dün- und Dickdarm. Werte gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Tabelle 22: Mittlere Relative Fluoreszenzmaxima und Zeitpunkt der Messung des Maximums der verschiedenen Organe nach F(ab')₂-Dy-Injektion (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter).

Organ	Mittleres Relatives Fluoreszenzmaximum	Zeitpunkt des Maximums [h]
Leber	9,53 ± 1,10	1
Niere	16,10 ± 2,50	1
Muskel	1,71 ± 0,02	1
Herz	2,12 ± 0,09	1
Lunge	2,65 ± 0,15	1
Milz	2,17 ± 0,26	1
Magen	1,70 ± 0,27	6
Dünndarm	5,87 ± 2,59	6
Dickdarm	21,55 ± 0,59	1

Betrachtete man den Einfluss der Organart auf die mittleren RFI-Werte der Organe nach F(ab')₂-Dy-Injektion (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen), so zeigte sich ein signifikanter Einfluss zu allen Zeitpunkten der Organentnahme. Die Werte unterschieden sich zwischen den Organen besonders stark zu den Zeitpunkten 1 und 24 h nach Sondeninjektion. Nach 6 h war eine etwas schwächere, aber dennoch deutliche Differenz der RFI-Werte zwischen den Organen nachweisbar (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Einfluss der Organart auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von 25 µg F(ab')₂-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Zeitpunkt	p-Wert
1 h	< 0,001
6 h	0,002
24 h	< 0,001

Bei genauerer Analyse durch Einzelwertvergleich der RFI-Werte sämtlicher Organe mit den mittleren RFI-Werte des Referenzgewebes Muskel (Bonferroni-Test), ergaben sich die in Abbildung 44 dargestellten p-Werte.

Auffällig war eine starke Fluoreszenzerhöhung der Organe Leber, Niere und Dickdarm 1 h nach F(ab')₂-Dy-Injektion im Vergleich zum Muskelwert. 6 h nach Injektion näherten sich die Relativen Fluoreszenzen sämtlicher Organe aneinander an, so dass hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der einzelnen Organe feststellbar war. 24 h nach Sondeninjektion jedoch wies die Leber noch eine deutliche höhere Relative Fluoreszenz im Vergleich zum Muskel auf und auch die Niere zeigte noch schwach signifikant höhere Werte als das Referenzgewebe.

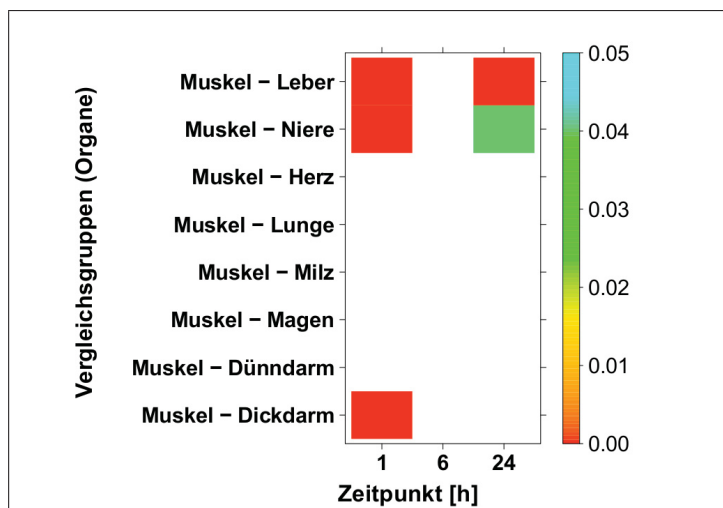


Abbildung 44: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem mittleren Relativen Fluoreszenzwert des Muskels und den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten von weiteren Organproben gesunder NMRI-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 25 µg F(ab')₂-Dy in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 43).

Der Einfluss des Organentnahmezeitpunktes auf die RFI-Werte der einzelnen Organe erwies sich als stark signifikant für fast alle Organe außer Magen und Dünndarm (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Einfluss des Zeitpunktes der Organentnahme auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben nach Injektion von 25 µg F(ab')₂-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Organ	p-Wert
Leber	< 0,001
Niere	< 0,001
Muskel	0,001
Herz	< 0,001
Lunge	< 0,001
Milz	< 0,001
Magen	0,057
Dünndarm	0,081
Dickdarm	< 0,001

Bei diesen beiden Organen wiesen die Mittelwerte zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h also keine signifikante Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zum Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert auf (siehe auch Abbildung 45), während bei allen anderen Organen deutliche Fluoreszenzerhöhungen nach Injektion von F(ab')₂-Dy im Vergleich zum jeweils nativen Organ vor Injektion der Sonde nachweisbar waren. Vergleich man nun die einzelnen Relativen Fluoreszenzmittelwerte der Organe zu den einzelnen Zeitpunkten nach F(ab')₂-Dy-Injektion mit dem jeweiligen mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert des glei-

chen Organs (Bonferroni-Test), so ergaben sich die in Abbildung 45 dargestellten p-Werte.

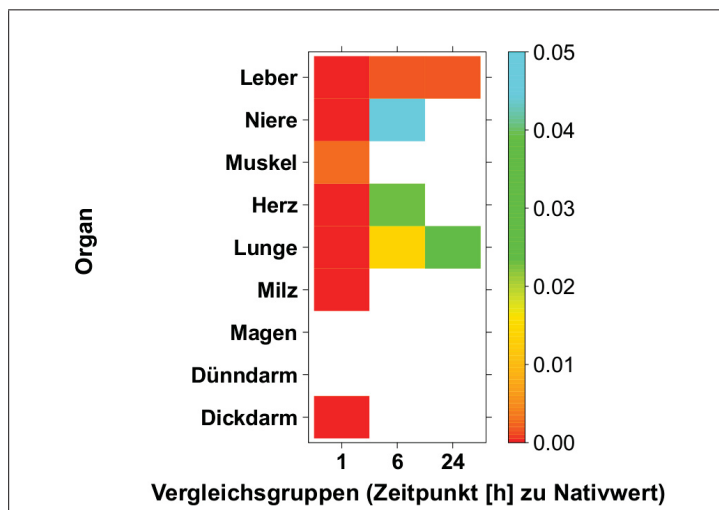


Abbildung 45: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert der einzelnen Organe und den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 25 μg F(ab')_2 -Dy in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 44).

Wie bereits erwähnt zeigten sich für Magen und Dünndarm keine signifikanten Fluoreszenzerhöhungen im Vergleich zu ihrem mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert. Sämtliche weiteren Organe jedoch wiesen 1 h nach F(ab')_2 -Dy-Injektion deutlich höhere RFI-Werte als vor Sondeninjektion auf. Die Fluoreszenz von Muskel, Milz und Dickdarm nahm bis 6 h nach Applikation von F(ab')_2 -Dy jedoch so stark ab, dass keine signifikante Differenz zum mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert mehr nachweisbar war. Niere, Herz und Lunge zeigten hingegen zum gleichen Zeitpunkt noch eine schwache Fluoreszenzerhöhung. Die Leber wies bis 24 h nach Sondeninjektion deutlich höhere RFI-Werte als vor Sondeninjektion auf und auch die Lunge zeigte nach 24 h noch eine leichte Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zum mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert.

5.6.2.4 F(ab')_2 -Dy

Wie bereits für IgG- und F(ab')_2 -Dy beschrieben wurden auch die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Organe nach F(ab')_2 -Dy-Injektion entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 9 ins Verhältnis zum jeweils entsprechenden Nativ-/Autofluoreszenzwert gesetzt. Die so ermittelten RFI-Werte wurden in Abbildung 46 dargestellt.

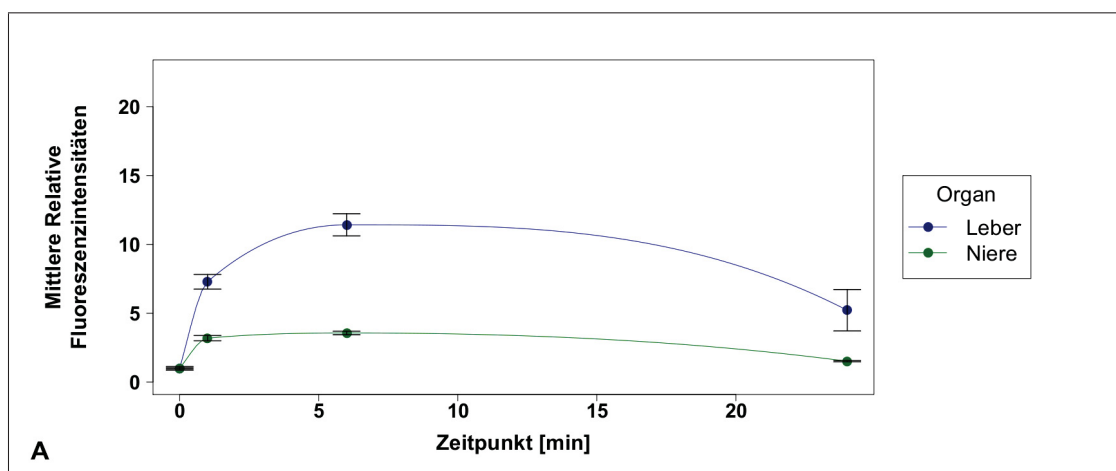


Abbildung 46: Abbildungserklärung siehe nächste Seite

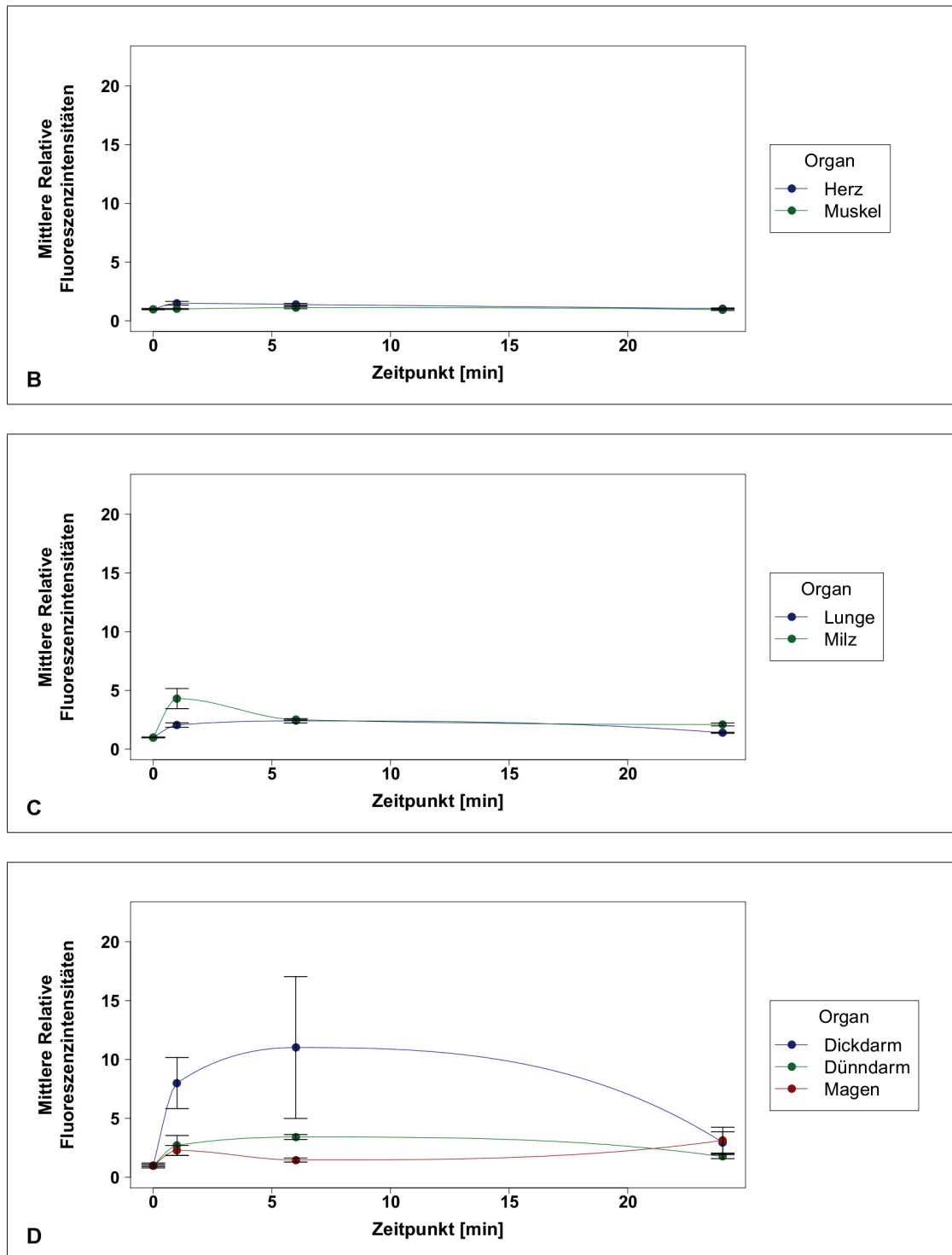


Abbildung 46: Mittlere Relative Fluoreszenzintensitäten der vollständigen entnommenen Organe vor (0 h) sowie 1, 6 und 24 h nach Injektion des Farbstoffs F(ab')-Dy (je 50 μg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zu nativen Organen. In Gruppen dargestellt wurden (A) die Eliminationsorgane Leber und Niere, (B) die Muskulären Organe Muskel und Herz, (C) die Organe Lunge und Milz und (D) die Verdauungsorgane Magen, Dünn- und Dickdarm. Werte gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Hier war erkennbar, dass die Verlaufskurven der Organe Muskel, Lunge, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Niere nach Injektion von F(ab')-Dy vergleichbar waren. Das Relative Fluoreszenzmaximum wurden nach 6 h sichtbar (siehe auch Abschnitt 5.6.2.5, Abbildungen 49, 5153, 57, 65 und 63). Die Fluoreszenzkurven der Organe Herz und Milz wiesen hingegen bereits zum Zeitpunkt 1 h das Ma-

ximum auf und fielen nach 6 h deutlich ab (siehe auch Abschnitt 5.6.2.5, Abbildungen 55 und 59). Der Magen nahm ähnlich wie nach Injektion von IgG-Dy (siehe Abschnitt 5.6.2.2) eine Sonderstellung ein, da sein Relatives Fluoreszenzmaximum 24 h nach F(ab')-Dy-Injektion auftrat. Es konnte kein weiteres Organ gefunden werden, in dessen Zeitverlauf nach Abfallen der Fluoreszenzintensitäten (Zeitpunkt 6 h) ein erneuter Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte (siehe auch Abschnitt 5.6.2.5, Abbildung 61).

Die höchste Relative Fluoreszenzintensität wies die Leber zum Zeitpunkt 6 h nach F(ab')-Injektion auf. Es folgte - ebenfalls nach 6 h - der Dickdarm an zweiter Stelle. Hier fiel zu jenem Zeitpunkt nach Organentnahme allerdings eine enorme Streuung der Relativwerte auf. Milz, Magen, Dünndarm und Niere zeigten mittelfluoreszente Werte. Die restlichen Organe fluoreszierten nur schwach (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Mittlere Relative Fluoreszenzmaxima und Zeitpunkt der Messung des Maximums der verschiedenen Organe nach F(ab')-Dy-Injektion (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter).

Organ	Mittleres Relatives Fluoreszenzmaximum	Zeitpunkt des Maximums [h]
Leber	11,42 ± 0,81	6
Niere	3,57 ± 0,13	6
Muskel	1,13 ± 0,10	6
Herz	1,50 ± 0,15	1
Lunge	2,41 ± 0,18	6
Milz	4,31 ± 0,85	1
Magen	3,13 ± 1,12	24
Dünndarm	3,42 ± 0,21	6
Dickdarm	11,02 ± 6,03	6

Betrachtete man den Einfluss der Organart auf die mittleren Relativen Fluoreszenzintensitäten *nach* Injektion von F(ab')-Dy (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen), so ergaben sich zu allen 3 Zeitpunkten deutliche signifikante p-Werte (siehe Tabelle 26). Zum Zeitpunkt 1 h nach Sondeninjektion unterschieden sich die einzelnen Organwerte sehr stark voneinander, während nach 6 und 24h ein nicht ganz so starker, aber dennoch deutlicher Einfluss der Organart auf die RFI-Werte ergab.

Tabelle 26: Einfluss der Organart auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von 50 µg F(ab')-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	< 0,001
6	0,007
24	0,007

Verglich man nun die einzelnen mittleren Relativen Organfluoreszenzintensitäten mit dem jeweiligen mittleren Relativen Fluoreszenzwerten des Referenzgewebes Muskel (Bonferroni-Test), so ergaben sich die in Abbildung 47 aufgeführten p-Werte. Offensichtlich zeigten im Einzelwertvergleich lediglich die Leber und der Dickdarm nach 1 h sowie die Leber nach 24 h signifikant höhere Werte als der

Muskel. Die RFI-Werte sämtlicher weiteren Organe glichen den Muskelwerten zu allen 3 Zeitpunkten zu stark, um signifikante Differenzen nachzuweisen.

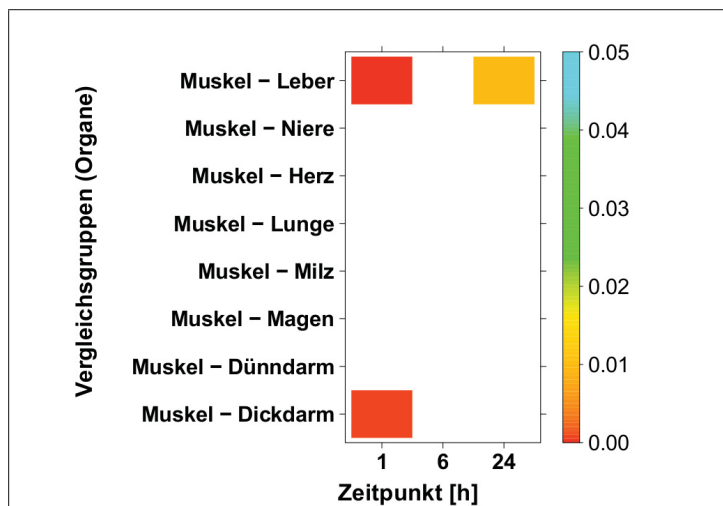


Abbildung 47: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem Relativen Fluoreszenzwert des Muskels und den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten von weiteren Organproben gesunder NMRI-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 50 μg F(ab')-Dy in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 45).

Der Einfluss des Organentnahmezeitpunktes nach F(ab')-Dy-Injektion auf die RFI-Werte wurde sehr unterschiedlich bewertet (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 27). Auf die Relativen Fluoreszenzintensitäten der Organe Muskel, Magen und Dickdarm hatte die Organentnahmezeit keinen signifikanten Einfluss, d. h. bei diesen Organen unterschieden sich die RFI-Werte der verschiedenen Zeitpunkte untereinander kaum. Die RFI-Werte zu den einzelnen Zeitpunkten nach F(ab')-Injektion wiesen jedoch untereinander hochsignifikante Differenzen für die Organe Leber, Niere und Lunge auf, mittelsignifikante Differenzen für das Organ Milz und schwach signifikante Differenzen für die Organe Herz und Dünndarm.

Tabelle 27: Einfluss des Zeitpunktes der Organentnahme auf die ermittelten RFI-Werte der Organproben nach Injektion von 50 μg F(ab')-Dy (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Organ	p-Wert
Leber	< 0,001
Niere	< 0,001
Muskel	0,283
Herz	0,013
Lunge	< 0,001
Milz	0,004
Magen	0,131
Dünndarm	0,023
Dickdarm	0,193

Bei genauerer Analyse der einzelnen RFI-Organwerte nach F(ab')-Dy-Injektion im Vergleich zu den jeweiligen mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwerten (Bonferroni-Test), ergaben sich die in Abbildung 48 dargestellten p-Werte.

Hier wird deutlich, dass 1 h nach F(ab')-Dy-Injektion alle Organe außer, wie oben bereits erwähnt, Muskel, Magen und Dickdarm, signifikant höhere Messwerte aufwiesen als vor Sondeninjektion. Die Stärke der Signifikanz variierte jedoch von schwach für das Organ Herz, über mittel für die Organe Leber, Lunge und Milz bis hoch für die Niere. 6 h nach F(ab')-Dy-Injektion zeigte neben Leber, Niere

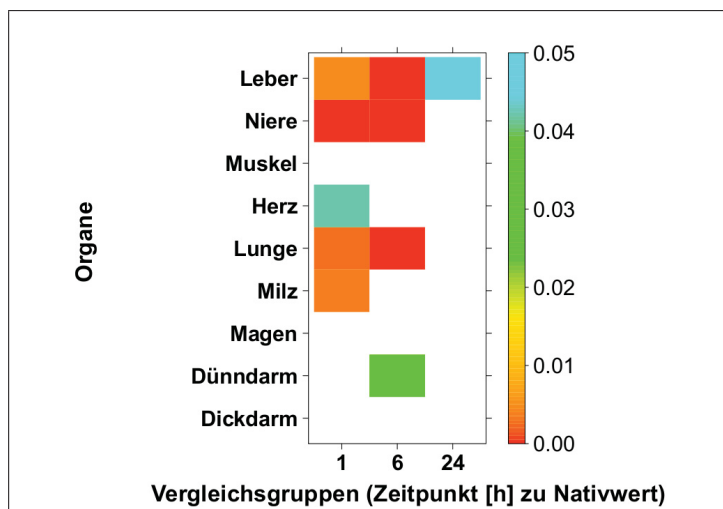


Abbildung 48: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen dem mittleren Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert der einzelnen Organe und den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von je 50 μg F(ab')-Dy in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 46).

und Lunge auch der Dünndarm eine signifikante Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zum entsprechenden Relativen Nativ-/Autofluoreszenzwert. Nach 24 h wies nur noch die Leber einen signifikant höheren RFI-Wert als im Nativzustand auf.

5.6.2.5 Vergleich der fluorooptischen Sonden untereinander

Um die Relativen Organfluoreszenzintensitäten der unterschiedlich farbstoffreichen Sonden IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy (unterschiedliche Farbstoff-Protein-Verhältnisse) miteinander vergleichen zu können, mussten die oben berechneten RFI-Werte *nach* Sondeninjektion entsprechend Abschnitt 4.8, Formel 10 ins Verhältnis zur jeweils injizierten Dy-Menge gesetzt werden (injizierte Dy-Menge siehe Abschnitt 4.6.4.2). Die so ermittelten normierten RFI-Werte (RFI_{norm}) wurden im Folgenden für jedes einzelne Organ in RFI_{norm}-Zeitpunkt-Diagramme aufgetragen, so dass sich jeweils eine Kurve für IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy ergab.

Bei Betrachtung der einzelnen Sondenkurven im Leberdiagramm (siehe Abbildung 49) fiel auf, dass die RFI_{norm}-Werte für IgG- und F(ab')-Dy einen ähnlichen Verlauf nahmen. Sie erreichten 6 h nach Sondeninjektion das Fluoreszenzmaximum, um bis 24 h nach Applikation unter das Niveau von Zeitpunkt 1 h abzufallen.

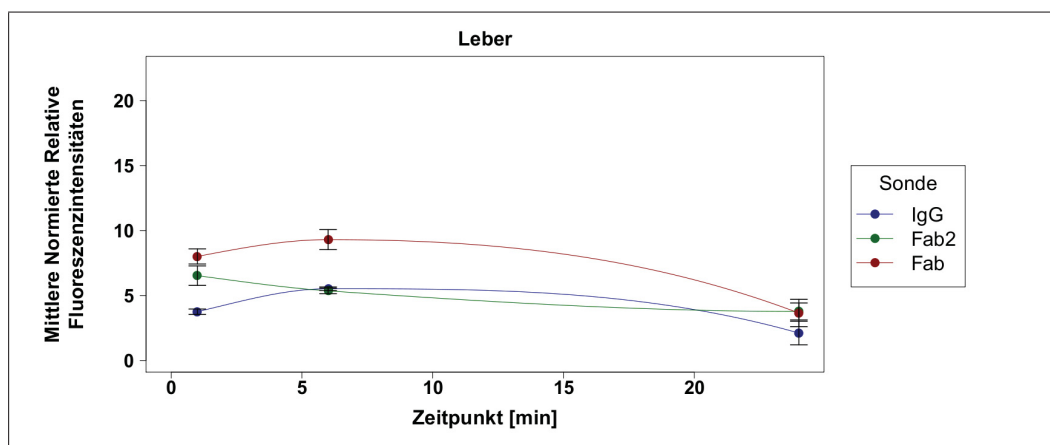


Abbildung 49: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Leber 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 μg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Die $F(ab')_2$ -Dy-Kurve hingegen hatte bereits nach 1 h das RFI_{norm} -Maximum erreicht, fiel zwischen 1 h und 6 h recht stark ab und blieb bis 24 h nach Sondeninjektion auf einem annähernd gleichem Niveau. 24 h nach $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Dy-Injektion waren die RFI_{norm} -Werte der Leber annähernd gleich, während die IgG-Dy-Werte deutlich niedriger ausfielen. Der Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) auf die RFI_{norm} -Werte der Leber war zu den Zeitpunkten 1 und 6 h nach Sondeninjektion mittelsignifikant, während der Einfluss 24 h nach Applikation zu vernachlässigen war (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen). Dies bedeutet, dass sich die Werte der einzelnen nur zu den ersten beiden Organentnahmezeitpunkten deutlich unterschieden. Zum Zeitpunkt 24 h waren die Werte der drei Sonden sehr ähnlich.

Tabelle 28: Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte der Leber zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus *NMRI*-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,001
6	0,003
24	0,305

Die genauere Analyse der Leber- RFI_{norm} -Werte mittels Einzelwertvergleich wurde in Abbildung 50 dargestellt. Hierbei wurden die Leberwerte zu den drei Organentnahmezeitpunkten nach Sondeninjektion für jede Sonde mit den jeweils anderen beiden Sonden verglichen, um signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Sondenwerten herauszustellen. Das gleiche Verfahren wurde für sämtliche anderen Organe durchgeführt (siehe unten).

Wie bereits im Globaltest (Test auf Zwischensubjekteffekte, siehe oben) herausgestellt, bestätigte sich die Ähnlichkeit der RFI_{norm} -Werte der drei Sonden zum Zeitpunkt 24 h, denn auch im Einzelwertvergleich wurden keine signifikanten Differenzen festgestellt. Hingegen unterscheiden sich die Werte der beiden Antikörperfragmentsonden zum Zeitpunkt 1 h nach Injektion signifikant vom IgG-Wert, während sie sich untereinander sehr ähnlich sind. Zum Zeitpunkt 6 h hingegen gleichen sich die Werte für $F(ab')_2$ an die IgG-Werte an und die $F(ab')$ -Werte unterscheiden sich deutlich von den Werten der beiden anderen Sonden.

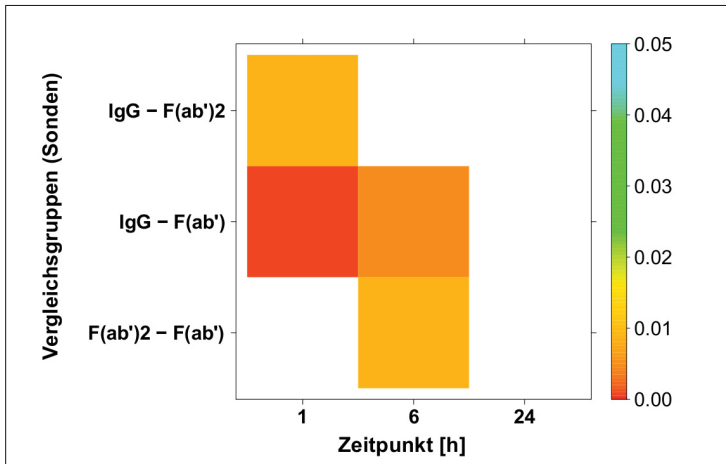


Abbildung 50: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 47).

Auch bei Betrachtung der Nierenkurven (siehe Abbildung 51) fiel auf, dass die Verläufe nach IgG- und F(ab')-Dy-Injektion sich stark ähnelten, während F(ab')₂-Dy sich deutlich unterschied.

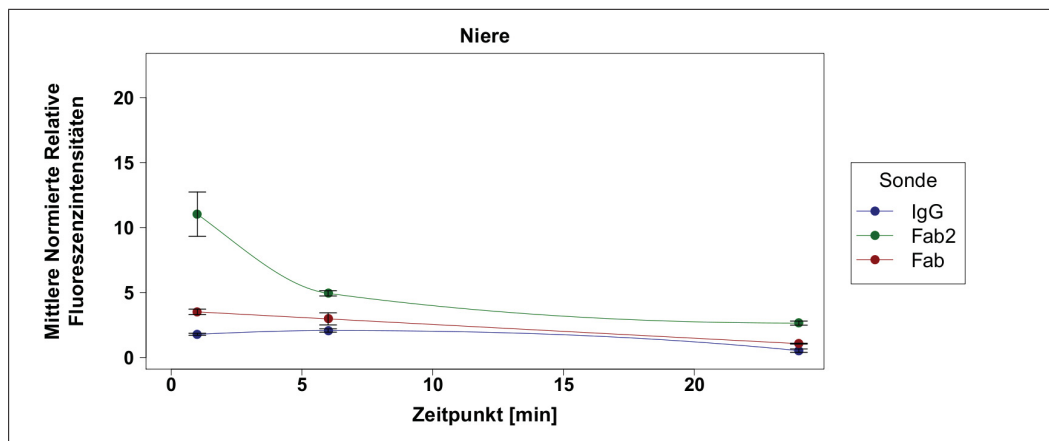


Abbildung 51: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Niere 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 µg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Nach Injektion der F(ab')₂-Sonde waren bereits zum Zeitpunkt 1 h sehr hohe RFI_{norm} -Werte zu erkennen und auch im Verlauf blieben die Werte zu allen Zeitpunkten über dem Niveau der beiden anderen Sonden. Nach F(ab')- und IgG-Dy-Injektion hingegen war die Anreicherung in der Niere zu allen Zeitpunkten recht niedrig, wobei nach F(ab')-Dy-Applikation jedoch zu allen 3 Organentnahmezeiten höhere RFI_{norm} -Werte nachweisbar waren als nach IgG-Dy-Gabe.

Der Einfluss der Sondenart auf die Nierenfluoreszenzwerte war zu allen 3 Organentnahmezeitpunkten sehr deutlich nachzuweisen (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 29). Dies bedeutet die Werte der drei Sonden unterschieden sich untereinander stark.

Tabelle 29: Einfluss der Sondenart (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte der Niere zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus NMRI-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen).

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	< 0,001
6	0,001
24	< 0,001

Dies bestätigt sich beim Einzelwertvergleich der drei Sonden untereinander (Bonferroni-Test, p-Werte dargestellt in Abbildung 52). Wie in der Grafik 51 zu vermuten, wies die Niere zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz zwischen den RFI_{norm} -Werten nach IgG-Dy-Gabe und den RFI_{norm} -Werten nach F(ab')-Dy-Injektion auf. Die Werte nach F(ab')- und IgG-Dy-Injektion unterschieden sich jedoch deutlich von denen nach F(ab')₂-Dy-Applikation.

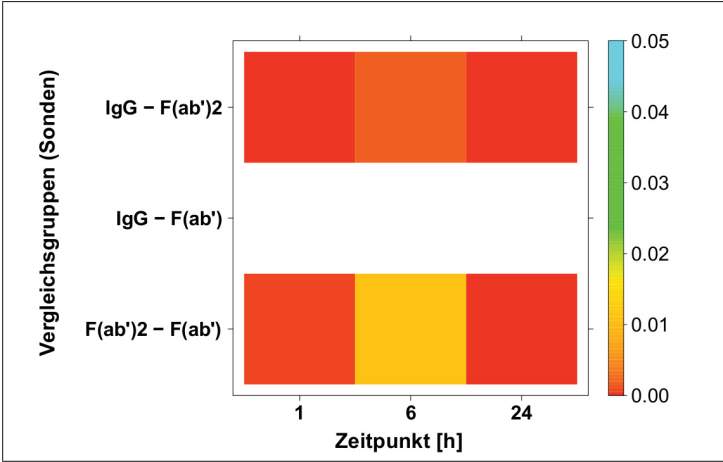


Abbildung 52: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')_2$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 48).

Die Muskelfluoreszenzkurven der drei Sonden verliefen durchweg recht flach und ähnlich (siehe 53). Lediglich die IgG-Kurve unterschied sich leicht, da die RFI_{norm} -Werte hierbei zu allen 3 Zeitpunkten noch unter dem Niveau der beiden anderen Sonden lagen.

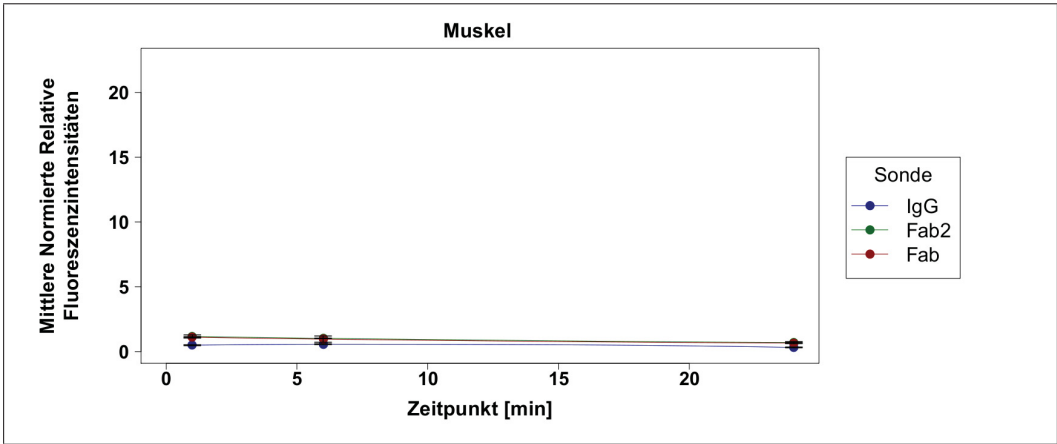


Abbildung 53: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Muskel 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')_2$ -Dy (je $50 \mu\text{g}$ Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Der Einfluss der Sondenart auf die RFI_{norm} -Werte des Muskels wurde zu den Zeitpunkten 1 und 24 h nach Sondenapplikation als signifikant eingestuft. Zum Organentnahmezeitpunkt 6 h glichen sich die Werte der drei Sonden zu stark, um einen signifikanten Einfluss nachzuweisen (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')_2$ -Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte des Muskels zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus *NMRI*-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	< 0,001
6	0,131
24	0,006

Die genauere Analyse der einzelnen Muskelwerte durch direkten Vergleich der drei Sondenwerte untereinander (Bonferroni-Test, p-Wert-Ergebnisse dargestellt in Abbildung 54) zeigte wie erwartet keinen signifikanten Unterschied zwischen den Antikörperfragmentsonden. Die IgG-Dy-Werte zu den oben bereits genannten Zeitpunkten 1 und 24 h jedoch waren vor allem nach 1 h signifikant niedriger als die Werte der $F(ab')_2$ - und der $F(ab')$ -Sonde.

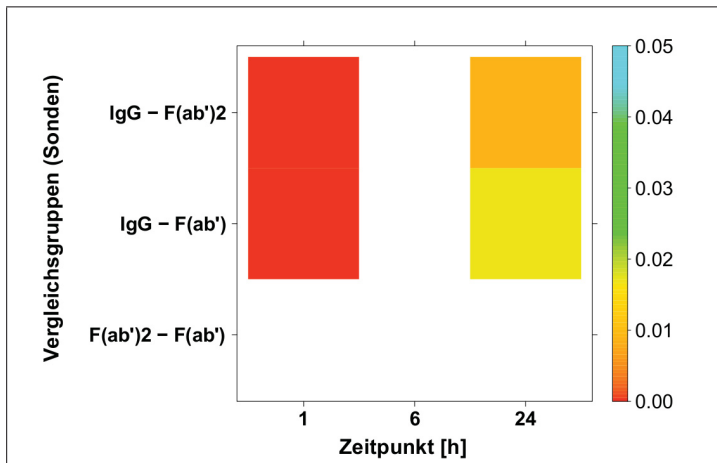


Abbildung 54: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Muskel zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluoro-optischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 49).

Verglichen mit den Muskelfluoreszenzen verhielten sich die RFI_{norm} -Werte des ebenfalls muskulären Organs Herz sowohl vom Verlauf wie auch von der Höhe der Werte her betrachtet sehr ähnlich. Auch hier verliefen die drei Sondenkurven sehr flach und auch hier waren sich die Verläufe der beiden Antikörperfragmentsonden extrem gleich, während die IgG-Dy-Kurve etwas niedriger verlief (siehe Abbildung 55).

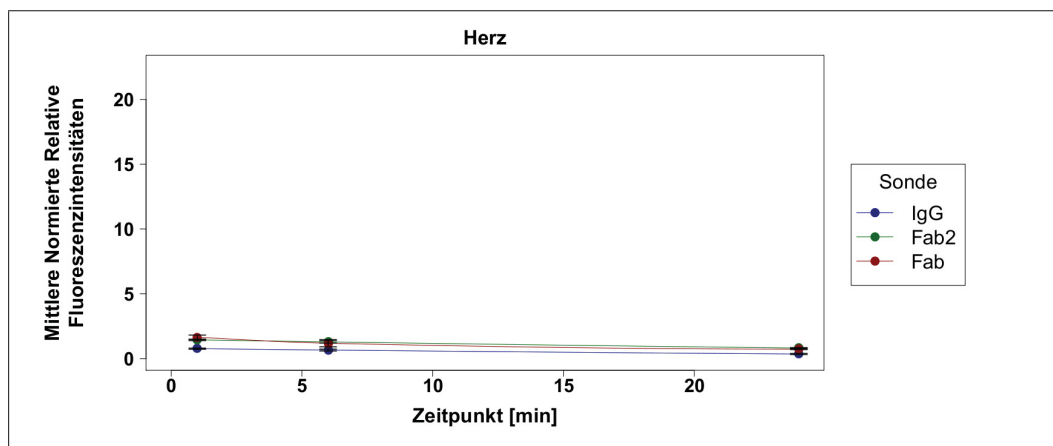


Abbildung 55: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Herz 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy (je $50 \mu\text{g}$ Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

So war es nicht verwunderlich, dass auch in der statistischen Analyse ähnliche Ergebnisse auftraten wie bei dem Organ Muskel. Zu den Zeitpunkten 1 und 24 h nach Sondenapplikation war der Einfluss der Sondenart entscheidend, während zum Zeitpunkt 6 h kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der 3 Sonden erkennbar war (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Werte-Ergebnisse siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Einfluss der Sondenart (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) auf die ermittelten RFI_{norm}-Werte des Herzens zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus NMRI-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,003
6	0,085
24	< 0,001

Im Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test, p-Wert-Ergebnisse siehe Abbildung 56) zeigte sich nun auch - vergleichbar mit der Analyse für das Organ Muskel - ein starke Ähnlichkeit der Herzwerte für die beiden Antikörperfragmentsonden zu allen Zeitpunkten. Signifikante RFI_{norm}-Wert-Differenzen konnten hier demnach nicht nachgewiesen werden. Wie zu erwarten waren jedoch die IgG-Dy-Werte nach 1 und 24 h signifikant niedriger als die Werte nach F(ab')₂- und F(ab')-Dy-Injektion.

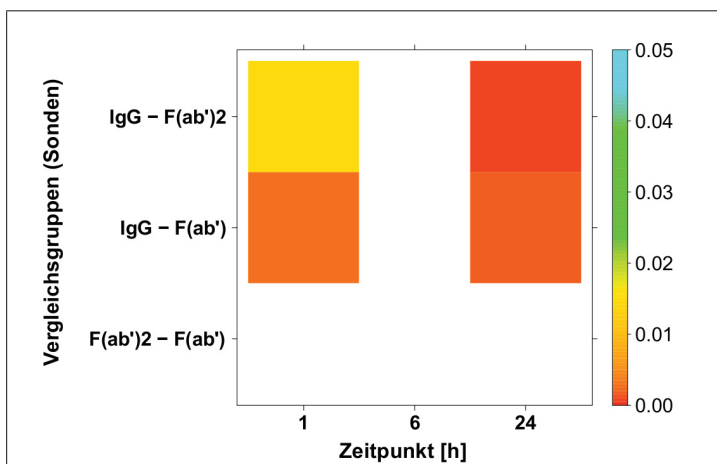


Abbildung 56: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm}-Werten des Organs Herz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) in NMRI-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 50).

Die Kurvenverläufe der drei Sonden im Lungendiagramm waren ebenfalls sehr flach und untereinander relativ ähnlich (siehe Abbildung 57).

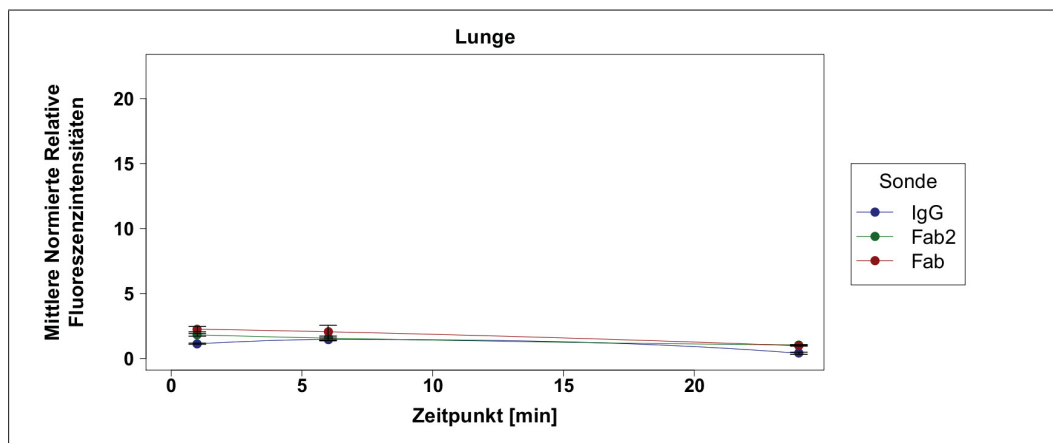


Abbildung 57: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Lunge 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 μ g Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Auffällig war, dass die RFI_{norm}-Werte der F(ab')-Sonde zu den Zeitpunkten 1 und 6 h etwas höher

waren als die der beiden anderen Sonden und zwischen 1 und 24 h kontinuierlich abnahmen. Die IgG-Dy-Werte hingegen nahmen zwischen 1 und 6 h zu, um zwischen 6 und 24 h deutlich abzufallen. Die RFI_{norm} -Werte des $F(ab')_2$ -Dy hatten wie nach $F(ab')$ -Dy-Applikation zum Zeitpunkt 1 h ihr Maximum, fielen bis 6 h nach Applikation jedoch stärker ab, um zwischen 6 und 24 h wiederum langsamer abzunehmen. Nach 24 h erreichten die Werte der beiden Antikörperfragmentsonden ein ähnliches Niveau während die IgG-Dy-Werte etwas darunter lagen.

Der Einfluss der Sondenart auf die RFI_{norm} -Werte der Lunge wurde nach statistischer Analyse als signifikant zu den Zeitpunkten 1 und 24 h nach Sondenapplikation eingestuft. Zum Organentnahmezeitpunkt 6 h waren die Werte der drei Sonden zu ähnlich, um einen signifikanten Einfluss der Sondenart festzustellen (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte der Lunge zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus *NMRI*-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt	p-Wert
1 h	0,001
6 h	0,405
24 h	< 0,001

Eine genauere Analyse der einzelnen Lungenwerte der drei Sonden (Bonferroni-Test) ergab die in Abbildung 58 dargestellten p-Werte. Hierbei wurde erkennbar, dass die Antikörperfragmentsonden wiederum sehr ähnliche Werte aufwiesen und ihre normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten sich deshalb zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschieden. Nach 1 und 24 h wiesen die Werte von $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Dy jedoch signifikant Differenzen im Vergleich zu den IgG-Dy-Werten auf.

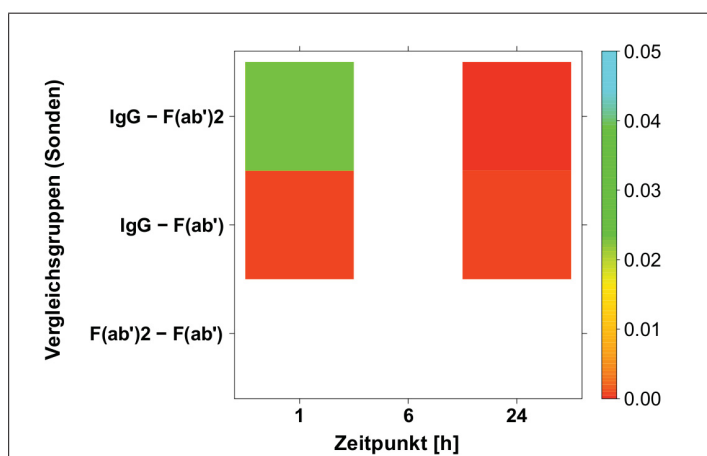


Abbildung 58: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 51).

Bei Betrachten der Milzkurven (siehe Abbildung 59) der drei fluorooptischen Sonden fiel auf, dass $F(ab')$ -Dy einen deutlich anderen Verlauf nahm als $F(ab')_2$ - und IgG-Dy. Zum Zeitpunkt 1 h nach Sondenapplikation war hier ein sehr hoher RFI_{norm} -wert erkennbar, während die Werte der anderen beiden Sonden deutlich darunter lagen. Zum Organentnahmezeitpunkt 6 h waren die $F(ab')$ -Milzwerte stark abgefallen, blieben jedoch zu allen Zeitpunkten über den Werten von IgG- und $F(ab')_2$ -Sonde. Die RFI_{norm} -Milzwerte des $F(ab')_2$ -Dy veränderten sich im Verlauf kaum und lagen 1 h nach Sonden-

applikation etwas unter den IgG-Dy-Werten, waren nach 6 h annähernd gleich den IgG-Dy-Werten und lagen 24 h nach Applikation etwas über den IgG-Dy-Werten.

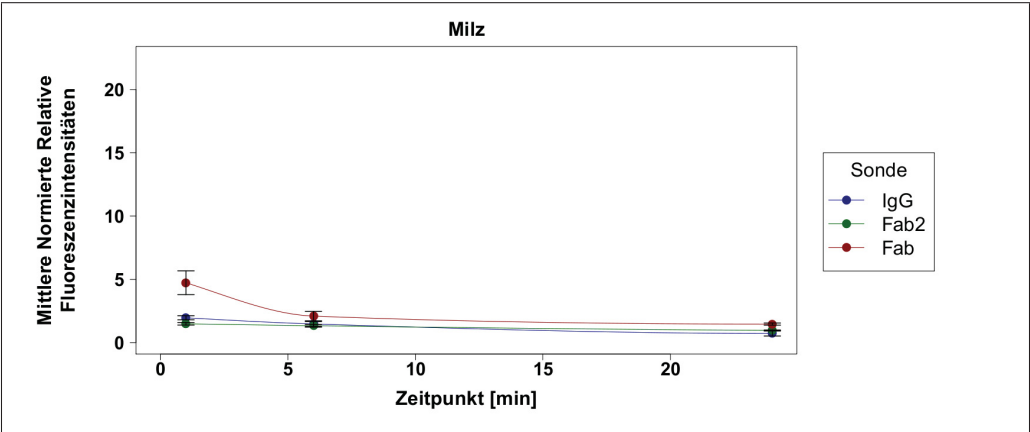


Abbildung 59: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Milz 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 µg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Der Einfluss der Sondenart auf die Milz-RFI_{norm}-Werte war zu den Zeitpunkten 1 und 24 h nach Sondeninjektion signifikant und zum Zeitpunkt 24 h zu vernachlässigen (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Einfluss der Sondenart (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) auf die ermittelten RFI_{norm}-Werte der Milz zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus NMRI-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,001
6	0,405
24	< 0,001

Im Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) war wie zu erwarten kein signifikanter Unterschied zwischen den F(ab')₂- und den IgG-Dy-Werten nachweisbar. IgG- und F(ab')-Sonde unterschieden sich jedoch zu den Zeitpunkten 1 und 24 h und F(ab')- und F(ab')₂-Sonde zum Zeitpunkt 1 h schwach signifikant (p-Wert-Ergebnisse in Abbildung 60 dargestellt).

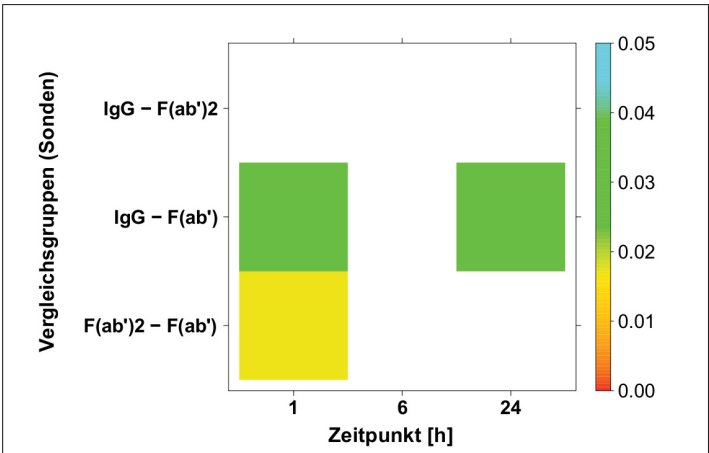


Abbildung 60: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm}-Werten des Organs Milz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) in NMRI-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 52).

In der Darstellung der RFI_{norm} -Werte des Magens für die drei Sonden gegen die Organentnahmezeit (siehe Abbildung 61) fiel auf, dass die IgG- und die F(ab')-Dy-Kurve einen sehr ähnlichen und außergewöhnlichen Verlauf nahmen, indem sie zwischen 1 und 6 h zunächst abfielen und dann bis 24 h auf das Kurvenmaximum wieder anstiegen.

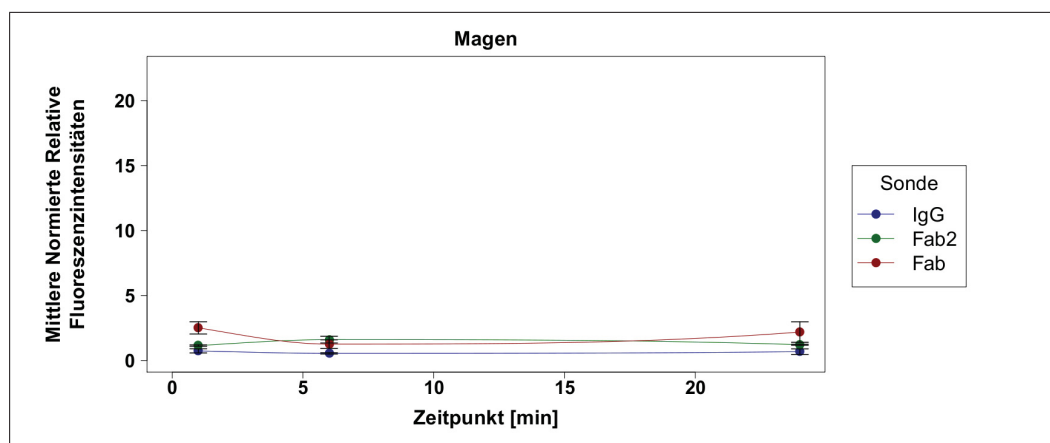


Abbildung 61: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Magen 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 µg Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Dabei lagen die F(ab')-Dy-Werte zu allen Zeitpunkten über den IgG-Dy-Werten. Die RFI_{norm} -Werte des Magens nach F(ab')₂-Injektion hingegen erreichten bereits nach 6 h ihr Maximum und lagen zu diesem Zeitpunkt über den Werten der anderen beiden Sonden. Zu allen anderen Zeitpunkten lagen die F(ab')₂-Dy-Werte zwischen denen der beiden anderen Sonden.

Der Einfluss der Sondenart auf die RFI_{norm} -Werte des Magens war zu den ersten beiden Organentnahmezeitpunkten schwach signifikant. Nach 24 h waren die Werte der drei Sonden sehr ähnlich (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse dargestellt in Tabelle 34).

Tabelle 34: Einfluss der Sondenart (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte des Magens zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus *NMRI*-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,012
6	0,047
24	0,132

Nach genauerer Analyse der einzelnen Werte der drei Sonden durch direkten Vergleich miteinander, ergaben sich die in Abbildung 62 grafisch dargestellten p-Werte. Dabei war zu erkennen, dass die RFI_{norm} -Wert-Erhöhung des F(ab')-Dy im Vergleich zu den anderen beiden Sonden zum Zeitpunkt 1 h nach Sondenapplikation schwach signifikant war. Zu allen weiteren Zeitpunkten waren die Werte der drei Sonden sehr ähnlich.

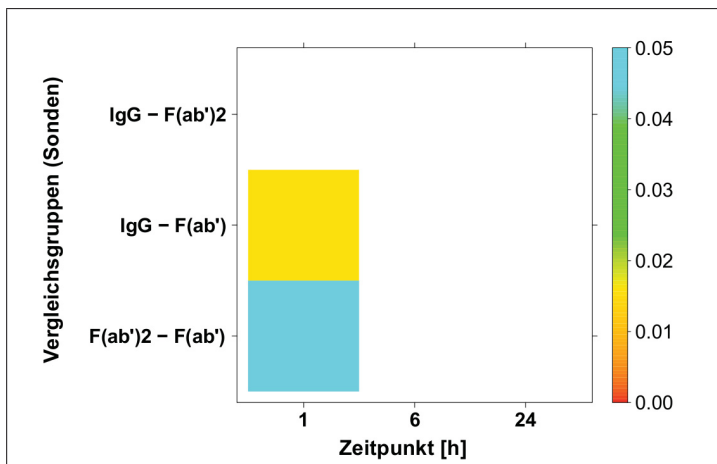


Abbildung 62: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Magen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 53).

Die Darstellung der RFI_{norm} -Werte des Dünndarms für die drei Sonden wurde in Abbildung 63 aufgeführt. Hier waren deutlich sondenspezifische Verläufe erkennbar. Die Werte der $F(ab')$ -Sonde beispielsweise verliefen zwischen den 3 Organentnahmezeitpunkten fast waagrecht und fielen lediglich zwischen 6 und 24 h leicht ab. Die IgG-Dy-Kurve hingegen wies bereits 1 h nach Sondenapplikation ein recht hohes Fluoreszenzmaximum auf, fiel dann steil ab und verlief daraufhin langsam abfallend unter dem Niveau der $F(ab')$ -Dy-Kurve. Die RFI_{norm} -Werte des $F(ab')_2$ -Dy zeigten wiederum einen völlig anderen Verlauf. Das Fluoreszenzmaximum lag hier bei 6 h während der 1 h-Wert zwischen denen der beiden anderen Sonden lag und der 24 h-Wert gemeinsam mit den Werten der beiden anderen Sonden auf einem Niveau. Zu beachten hierbei war jedoch eine große Varianz fast aller RFI_{norm} -Mittelwerte des Dünndarms, vor allem zu den Zeitpunkten 1 und 6 h.

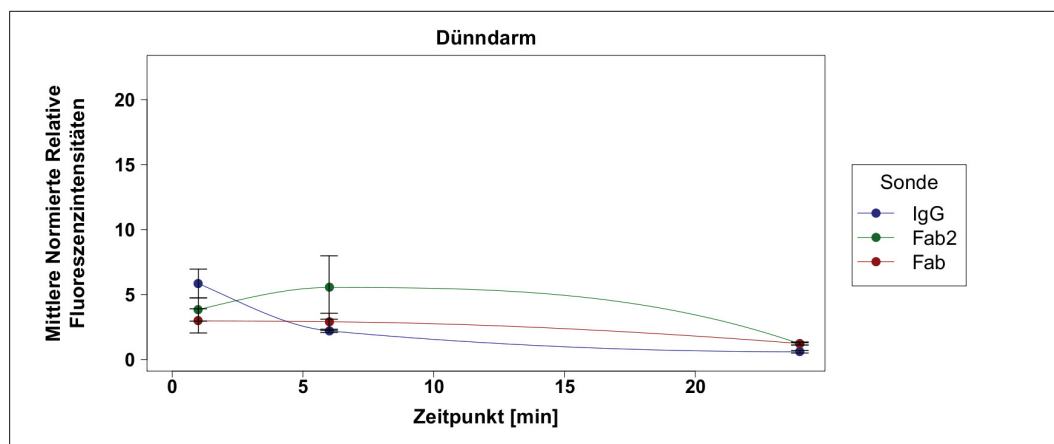


Abbildung 63: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Dünndarm 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy (je $50 \mu\text{g}$ Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Der Einfluss der Sondenart auf die oben dargestellten RFI_{norm} -Dünndarmwerte fiel entsprechend der großen Varianz zu den Zeitpunkten 1 und 6 h nicht signifikant aus. Lediglich 24 h nach Sondenapplikation wurde ein schwach signifikanter Einfluss nachgewiesen (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Einfluss der Sondenart (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) auf die ermittelten RFI_{norm}-Werte des Dünndarms zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus NMRI-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,371
6	0,304
24	0,009

Bei genauer Analyse der einzelnen RFI_{norm}-Werte des Dünndarms durch Vergleich zwischen den Sonden zum oben genannten Zeitpunkt 24 h (Bonferroni-Test), stellte sich eine schwach signifikante Differenz zwischen den Antikörperfragmentsondenwerten und den IgG-Dy-Werten heraus (p-Werte in Abbildung 64 grafisch dargestellt).

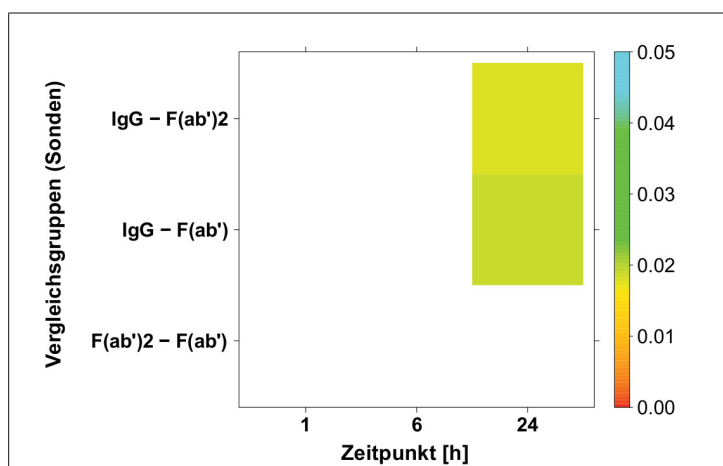


Abbildung 64: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm}-Werten des Organs Dünndarm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy) in NMRI-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 54).

Nach Auftragung der Dickdarmwerte ins RFI_{norm}-Zeit-Diagramm (siehe Abbildung 65) konnte man erkennen, dass die Werte von F(ab')- und IgG-Dy wiederum einen ähnlichen Verlauf nahmen. Die Werte des F(ab')-Dy lagen hierbei zu den ersten beiden Zeitpunkten über denen des IgG-Dy. Beide Kurven erreichten nach 6 h das Fluoreszenzmaximum und nach 24 h waren die Werte beider Sonden auf ein ähnlich niedriges Niveau abgefallen.

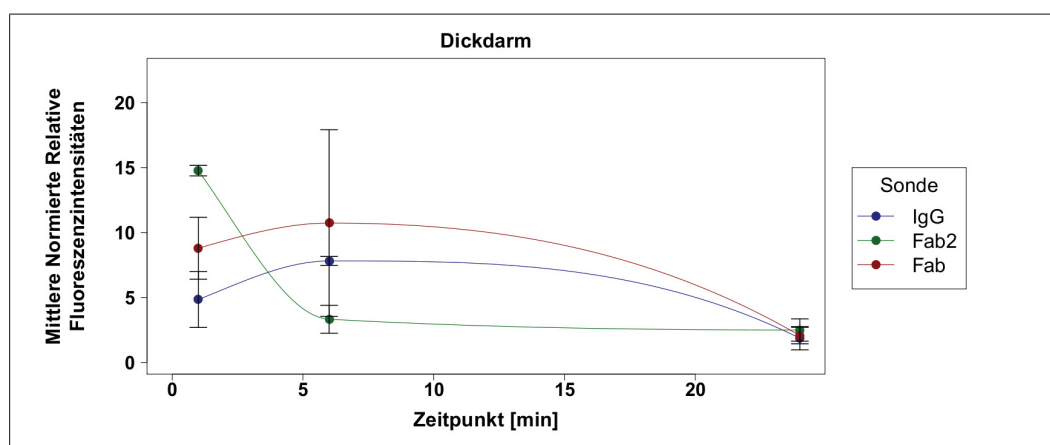


Abbildung 65: Normierte Relative Fluoreszenzintensitäten des Organs Dickdarm 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (je 50 μ g Protein injiziert) in je 3 gesunde Mäuse im Verhältnis zum nativen Organ. Gemessen mittels optischen Kleintierscanner (Belichtungszeit 1,5 sec; binning factor 1; 660/735 nm-Filter). Mittelwerte aufgetragen mit Standardfehler.

Ganz anders verhielt es sich mit der $F(ab')_2$ -Dy-Kurve. Hier war bereits 1 h nach Sondenapplikation das Fluoreszenzmaximum erreicht, welches noch über dem des $F(ab')$ -Dy lag. Bis 6 h waren die Werte stark abgefallen und nahmen bis 24 h nach $F(ab')$ -Dy-Injektion einen langsam abflachenden Verlauf, um auf ein ähnlich niedriges Niveau wie die $F(ab')$ - und IgG-Dy-Werte zu gelangen. Auffällig war hierbei auch eine recht große RFI_{norm} -Wertevarianz, vor allen zu den ersten beiden Messzeitpunkten.

Der Einfluss der Sondenart auf die Dickdarmwerte wurde dementsprechend kaum als relevant eingestuft. Lediglich zum Zeitpunkt 1 h wurde eine schwach signifikante Differenz zwischen den RFI_{norm} -Werte der drei Sonden festgestellt (Test auf Zwischensubjekteffekte, univariate Varianzanalyse mit Messwiederholungen, p-Wert-Ergebnisse siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Einfluss der Sondenart (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) auf die ermittelten RFI_{norm} -Werte des Dickdarms zu den verschiedenen Zeitpunkten der Organentnahme aus *NMRI*-Mäusen nach Sondeninjektion (p-Wert-Ergebnisse des Tests auf Zwischensubjekteffekte als Globaltest für den Organart in der univariaten Varianzanalyse für Messwiederholungen). Nicht signifikante Werte grau hinterlegt.

Zeitpunkt [h]	p-Wert
1	0,015
6	0,509
24	0,731

Dies spiegelte sich auch im Einzelwertvergleich der drei Sonden untereinander wider. Ausschließlich zwischen IgG- und $F(ab')_2$ -Dy wurde die RFI_{norm} -Differenz zum Zeitpunkt 1 h nach Sondenapplikation als schwach signifikant eingestuft (Bonferroni-Test, p-Werte in Abbildung 66 grafisch dargestellt).

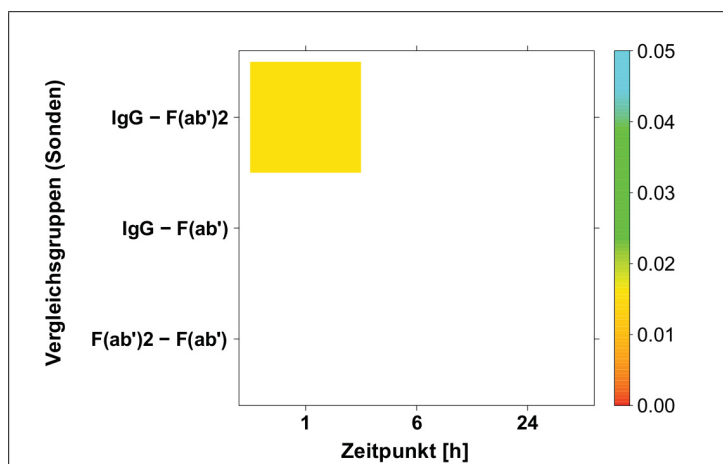


Abbildung 66: Grafische Darstellung des statistischen Vergleichs zwischen den RFI_{norm} -Werten des Organs Dickdarm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion je einer fluorooptischen Sonde (IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy) in *NMRI*-Mäuse in Form einer Heatmap. Die mittels Einzelwertvergleich (Bonferroni-Test) errechneten p-Werte wurden entsprechend der rechts aufgeführten Farbskala kodiert, weiße Felder stehen für nicht signifikante p-Werte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Auflistung der p-Werte siehe Anhang, Tabelle 55).

6 Diskussion

Im Verlauf dieser Arbeit ist es gelungen, eine Methode zur enzymvermittelten Antikörperspaltung mit Hilfe von Papain und Pepsin erfolgreich zu etablieren. Somit konnten die Antikörperfragmente $F(ab')_2$ und $F(ab')$ hergestellt werden. Im Folgenden wurden neue, kleinmolekulare fluorooptische Sonden durch Kopplung dieser IgG-Fragmente an den Dy-676-Farbstoff synthetisiert und *in vitro*, *in vivo* sowie *ex vivo* charakterisiert bzw. mit dem großmolekularen IgG-Dy verglichen. Die bildgebende Darstellung pharmakokinetischer Eigenschaften mit Hilfe des neuartigen biooptischen Kleintierscanners *bonSAI@* erwies sich als sinnvoll.

6.1 Die neuen kleinmolekularen fluorooptischen Sonden

Während der Experimente zur Enzymspaltung des IgG war ein recht hoher Proteinverlust zu verzeichnen. Ähnliche Probleme fanden sich auch bei Bornemann et al., deren Arbeitsgruppe Fluoreszenz-gekoppelte $F(ab')$ - und $F(ab')_2$ -Fragmenten zur Detektion von humanem Erythropoietin *in vitro* entwickelten. Hier wurde ein methodisch ähnliches Kit vom gleichem Hersteller (Pierce) verwendet, jedoch mit Ficin als Endoprotease. Nach der Eluierung erreichten Bornemann et al. sogar nur 9 % des eingesetzten IgG als Ausbeute, wobei das Eluat ebenfalls $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Fragmente enthielt (Bornemann et al. 2003). Da der höchste Proteinverlust während des Papain-/Pepsin-Verdaus im Verlauf der Verdaulösung-Herstellung auftrat (siehe 5.2.1), ist zu vermuten dass die Trennung der Verdaulösung vom Enzym-Gel mittels des Harz-Separators ineffektiv war. Solch ein Seeparierungsverfahren wurde auch bei Bornemann et al. eingesetzt und bei dem neueren Pierce-Produkt durch ein Verfahren zur Zentrifugation über Trennharz ersetzt. Hierbei wirken weitaus größere Kräfte als bei der einfachen manuellen Trennung der Verdaulösung vom Enzym-Gel durch Eindrücken eines Harz-Separators. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit bei beiden Verdauvorgängen eine weitaus höhere Ausbeute an Eluat als bei Bornemann et al. erzielt werden (siehe 5.2.1, Abbildung 20). Die hergestellten $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Lösungen waren in dieser Menge mehr als ausreichend für die folgende Kopplung und Erforschung der neuen fluorooptischen Sonden.

Der 50 %ige Proteinverlust der Fc-Fragmente nach der Dialyse überschreitet den vom Hersteller angegebenen Bereich (bis 10 % Verlust), obwohl der cut-off-Wert der *ICONTM*-Concentrators (20 kDa) weit unter dem in der Literatur beschriebenen (53 kDa) (Gudihal et al. 2008) und sich in der SDS-PAGE darstellenden (etwa 40 kDa) Molekulargewicht der Fc-Fragmente liegt. Ein anzunehmender Grund hierfür wäre, dass der bei dieser Proteinprobe verwendete *ICONTM*-Concentrator entweder durch die Produktion oder durch falsche Handhabung möglicherweise fehlerhaft war. Die entstandenen dialysierten Fc-Fragmente waren jedoch in ausreichender Menge vorhanden, um in der SDS-PAGE dargestellt zu werden. Dass die hier aufgetretene Bande unter dem in der Literatur beschriebenen Molekulargewicht liegt, könnte im Zusammenhang mit der recht langen Inkubationszeit von 16 h stehen, währenddessen die IgG-Moleküle durch die Endoprotease Papain gespalten wurden. Bei Gudihal et al. lag die Inkubationszeit lediglich bei 2 h. Es ist vorstellbar, dass bereits von den $F(ab')$ -Fragmenten abgespaltene Fc-Fragmente bei längerer Inkubationszeit weiter enzymatisch verdaut werden.

Bei Dialyse der Fc-Subfragmente trat hingegen nur ein kleiner Proteinverlust auf, obwohl sie nach Pepsinverdau von Maus-IgG laut Literatur ein Molekulargewicht von immerhin 27 kDa besitzen müssten (Dissanayake und Hay 1975) - ähnlich dem cut-off-Wert der *ICONTM*-Concentrators (20 kDa).

Somit wäre ein höherer Verlust zu erwarten gewesen. Auch waren die Fc-Subfragmente in der SDS-PAGE nicht darstellbar, es zeigte sich lediglich eine Bande in Höhe des Molekulargewichts von ungespaltenem IgG. Möglicherweise lagen also die Fc-Subfragmente in zu kleiner Konzentration vor. Die Sensitivität von Coomassie R-250 nach einmaliger Färbung beträgt bis zu 50 ng Protein, darunter ist keine sichtbare Anfärbung mehr möglich (Fernandez-Patron et al. 1995). Da die aufgetragene Probe 1 μ g Gesamtprotein beinhaltete, sollte der Anteil an Fc-Subfragmenten somit theoretisch weniger als 5 % des aufgetragenen Gesamtproteins betragen, damit sich die pFc'-Bande nicht darstellt. Die Darstellbarkeit könnte durch Doppelfärbetechnik mit Coomassie R-250 (Sensitivität bis zu 1,6 ng) (Fernandez-Patron et al. 1995) oder mittels Western Blot (Sensitivität im Pikogramm-Bereich) (Blake et al. 1984) überprüft werden. Für die Herstellung der neuen fluorooptischen F(ab')₂- und F(ab')-Sonden - das eigentliche Ziel dieser Arbeit - wurde der Nachweis der pFc'-Fragmente jedoch als irrelevant angenommen.

Nichtsdestotrotz wird durch diese Erkenntnisse die Theorie unterstützt, dass die pFc'-Lösung hauptsächlich aus großen IgG-Molekülen bestand. Eine mögliche Erklärung kann man finden, wenn man das Pepsinverdau- und Aufreinigungsverfahren genauer betrachtet: Nur der kleine Teil der Fc-Subfragmente mit anhängendem und intaktem Fc-Rezeptor kann in der ProteinA-Säule zurückgehalten werden, die restlichen pFc'-Fragmente werden mit den F(ab')₂-Fragmenten eluiert, anschließend durch Dialyse aus der F(ab')₂-Lösung entfernt und verworfen. Unverdautes IgG hingegen wird komplett durch die Säule zurückgehalten. Aus diesem Grund gibt es nach Pepsinverdau auch eine größere Differenz zwischen der Gesamtproteinmenge der Verdaulösung und der Gesamtproteinmenge aus F(ab')₂- und pFc'-Lösung (siehe 5.2.1, Abbildung 20B).

Weder nach Auftragen der F(ab')- noch der dialysierten F(ab')₂-Lösung wurden sichtbare Banden im Fc- bzw. pFc'-Bereich gefunden. Dies spricht für eine gute Reinheit der Proteinproben als ideale Voraussetzung dafür, dass die nach der Farbstoff-Kopplung folgenden pharmakokinetischen Versuche Sonden-spezifische Ergebnisse liefern.

Nach Kopplung von IgG-, F(ab')₂, F(ab') und antiCEA-F(ab') an den Farbstoff Dy-676 wurden zwei Peaks (*dt.* Gipfel) im Absorptionsspektrum der Protein-Dy-Sonden nachgewiesen (siehe 5.2.2, Abbildung 22). Dies stand im Gegensatz zum Absorptionsspektrum des reinen Dy-676 (siehe 4.2). Während der zweite Gipfel um 674 nm die Absorption des Dy-676 anzeigt, steht der nur nach Proteinkopplung aufgetretene erste Gipfel um 630 nm (kürzerwellig) für die in der Literatur oftmals beschriebene Dimerbildung der Dy-gekoppelten Proteine (H-Aggregate). Bereits Mujumdar et al. konnten diese Dimerisierung für an Cy5.205 (strukturähnlich dem Dy-676) gekoppelte Antikörper aufzeigen (Mujumdar et al. 1996). Sie stellt ein bekanntes Problem bei der Biokonjugation von Fluoreszenzfarbstoffen z. B. auch an DNA (Randolph und Waggoner 1997) und andere Proteine (Berlier et al. 2003) dar.

Durch die Dimerbildung erfolgt die reine Absorption von Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich, jedoch keine Emission, weshalb man von „nichtfluoreszenten Aggregaten“ spricht. Dies entspricht somit dem Problem des Fluoreszenz-Quenchings. Der Nachweis dieser Aggregation erfolgte für Dy-676-gekoppeltes antiCEA-F(ab') bereits durch Pauli et al. (Pauli et al. 2009). Wie bei dieser Arbeitsgruppe wurde also auch bei den in der vorliegenden Arbeit hergestellten Antikörpersonden und neuen fluorooptischen Antikörperrfragmentsonden eine erhebliche Aggregation nachgewiesen. Das Phänomen erklärt auch niedrige Quantenausbeute von F(ab')-Dy im Vergleich zu Quantenausbeute des reinen Dy-676 (0,07 vs. 0,31). Eine Reduktion der Dimerbildung und somit eine Erhöhung der Quantenausbeute wurde jedoch unter Zugabe von BSA betrachtet (Pauli et al. 2009, Pauli et al. 2010), d. h. unter Bedingungen ähnlich denen im Blutkreislauf, durch elektrostatische und hydropho-

be Dy-BSA-Interaktionen. Es steht deshalb zu erwarten, dass die Fluoreszenzemission bei Anwendung im Organismus die Fluoreszenzemission *in vitro* weit übersteigt, da die Sondenmoleküle sich voneinander lösen und im Organismus verteilen.

Bezüglich der ermittelten Farbstoff-Protein-Verhältnisse der fluorooptischen Sonden fiel auf, dass bei Einsatz einer größeren Dy-Menge keine höheren Farbstoff-Protein-Verhältnisse erreicht werden konnten, sondern dass die Verhältnisse teilweise sogar niedriger ausfielen als bei Einsatz einer kleineren Menge Dy. Auch Ballou et al. beschrieben ein maximal erreichbares Farbstoff-Protein-Verhältnis von 10 für fluorchromgekoppelte Antikörper (Ballou et al. 1997). Das hier auftretende Problem könnte wiederum das oben beschriebene Selbst-Quenching der Sonden durch Dy-Dy-Interaktionen darstellen. Dadurch erfolgt eine niedrigere Lichtabsorption bei 674 nm, da ein erheblicher Teil des Anregungslichtes bei etwa 630 nm durch die H-Aggregate absorbiert wird. Da das Farbstoff-Protein-Verhältnis jedoch mit Hilfe der Absorption bei 674 nm berechnet wird, erhält man deshalb niedrigere berechnete Dy-Konzentration und somit niedrigere Farbstoff-Protein-Verhältnisse als ohne Dimerbildung zu erwarten wäre. Die nichtfluoreszierenden Aggregate fallen aus der Berechnung heraus. Das Farbstoff-Protein-Verhältnis gibt somit nicht das reale Verhältnis von Farbstoffmenge zu Proteinmenge in der Sondenlösung an, sondern das „effektive“ Verhältnis, d. h. das Verhältnis von *fluoreszierendem* Dy zu vorhandenem Protein. Je mehr und je dichter der Dy-676 auf der Oberfläche der Proteine gekoppelt ist, desto stärker werden die Dy-Dy-Interaktionen (Berlier et al. 2003, Pauli et al. 2010), so dass bei einem Farbstoff-Protein-Verhältnis von etwa 12 - 13 für IgG eine Grenze erreicht wird, oberhalb derer bei Einsatz höherer Dy-Mengen die nichtfluoreszierenden Aggregate stetig zunehmen, der Anteil der fluoreszierenden Antikörper jedoch gleich bleibt oder gar abnimmt. Für $F(ab')_2$ und $F(ab')$ liegt das maximale Farbstoff-Protein-Verhältnis noch unter dem der IgG-Sonde, da diese Moleküle kleiner sind und somit weniger Dy gebunden werden kann. Die Bindung des Dy-Farbstoffs ist nämlich zunächst abhängig von der Zahl an freien Aminogruppen im Protein (Brinkley 1992). Dennoch übersteigt das Verhältnis des $F(ab')$ -Dys das des $F(ab')_2$ -Dy um einiges, obwohl das $F(ab')_2$ -Molekül ein mehr als doppelt so großes Molekulargewicht besitzt. Man könnte hierbei strukturelle bzw. konformatorische Einflüsse in Betracht ziehen, die die Farbstoffbindung und -fluoreszenz ebenso fördern oder behindern könnten. Vorstellbar wäre, dass im „inneren“ Molekülbereich des Zusammentreffens der beiden Arme des $F(ab')_2$ -Dys starkes Quenching stattfindet, da hier gebundene Dy-Moleküle dicht zusammenlagern. Auch könnte es möglich sein, dass in ebendieser Region aus räumlichen Gründen weniger Dy-Moleküle binden können als im gleichen Molekülbereich am freien $F(ab')$ -Arm der $F(ab')$ -Sonde (siehe Abbildung 67).

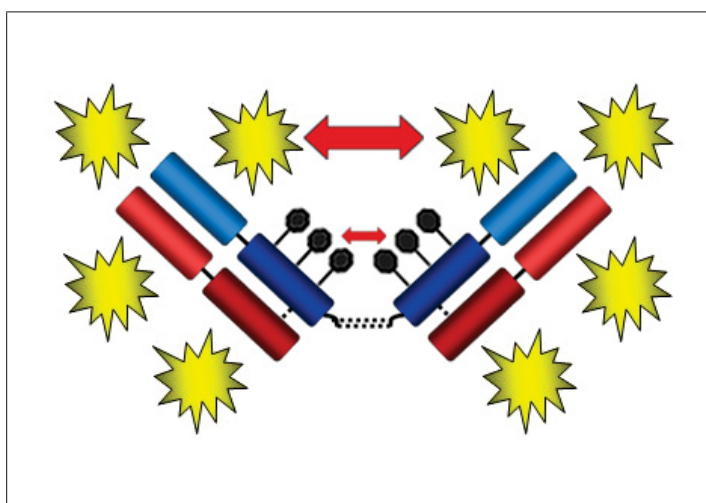


Abbildung 67: Schematische Darstellung der Molekülstruktur der $F(ab')_2$ -Dy-Sonde. Gelbe Sterne - fluoreszierende Dy-Moleküle, schwarze runde Moleküle - nichtfluoreszierende Dy-Moleküle. Im Bereich des Zusammentreffens der beiden $F(ab')$ -Arme des Moleküls lagern gebundene Dy-Moleküle möglicherweise dichter zusammen als in anderen Bereichen (siehe Länge der Pfeile). Es ist denkbar, dass dadurch starkes Quenching stattfindet.

Trotz der Unterschiede der Farbstoff-Protein-Verhältnisse zwischen den hergestellten Antikörper- und Antikörper-Fragmentsonden fluoreszierten dennoch alle drei Sonden in ausreichendem Maße, um sie erfolgreich *in vitro*, *in vivo* sowie *ex vivo* einzusetzen. Die Differenzen konnten durch mathematische Berechnungen ausgeglichen und die drei Sonden somit sinnvoll verglichen werden.

Sonden ähnlichen Molekulargewichts und ähnlicher Struktur hingegen, wie beispielsweise die F(ab')- und die antiCEA-F(ab')-Dy-Sonde, wiesen ähnliche Farbstoff-Protein-Verhältnisse sowie eine ähnliche Quantenausbeute auf (antiCEA-F(ab')-Dy $\Phi = 0,05$, Kooperation mit Frau Dr. Jutta Pauli, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Bundesamtes für Materialforschung und -prüfung Berlin). Dies untermauert die Erkenntnisse von Brinkley et al., dass die Farbstoffbindung von der Anzahl freier Aminogruppen im Proteinmolekül abhängt (Brinkley 1992), unterstützt aber auch die Theorie, dass strukturelle/konformationale Einflüsse durchaus vorhanden sein könnten.

6.2 *In vitro*-, *in vivo*- und *ex vivo*-Versuche zum Carcinoembryonalen Antigen

Innerhalb der Fluoreszenz-Messwerte zeigte sich eine steigende Ungenauigkeit bzw. Streuung mit Zunahme der Belichtungszeit (3 bis 6 sec). Der Grund hierfür liegt in einer Annäherung an einen Grenzwert des Bildgebungssystems *bonSAI@* bei hohen Fluoreszenzintensitäten, oberhalb dessen die Intensität der Fluoreszenz nicht mehr unterschieden werden kann. Dies bedeutet, dass bei langen Belichtungszeiten die Spezifität der Messmethode bei gleichzeitig hoher Sensitivität sinkt. Bei kurzen Belichtungszeiten (0,5 bis 1 sec) hingegen konnten die Werte nativ-kontrastmittelinkubiert schlecht abgegrenzt werden, da nur ungenügend Anregungsenergie für die Fluoreszenzemission bereitgestellt wird. Im Kurzbelichtungsbereich verhält es sich somit umgekehrt - die Spezifität der Methode ist hoch, die Sensitivität jedoch gering. Es erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll, einen Kompromiss zu schließen und in der Praxis mittlere Belichtungszeiten von 1 bis 2 sec zu wählen. Dies entspricht auch den bisherigen Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena bei Verwendung des gleichen NIRF-Bildgebungssystems: Hansch et al. wählten für die Bildgebung von Arthritis in Mäusen mit freiem Cy5.5 eine Belichtungszeit von 1-2 sec (Hansch et al. 10/2004) und Hilger et al. betrachteten zur Bildgebung von Brustkrebs an Mäusen mit Cy5.5-gekoppelten Her2/neu-Antikörper-Sonden eine Belichtungszeit von 2 sec als ideal (Hilger et al. 2004).

Die *in vitro*-Versuche mit F(ab')-Dy-Inkubation der LS174T und A375-Zellen ließen erkennen, dass die ausgewählten Tumorzellen keine spezifischen Wechselwirkungen mit der Sonde aufweisen. Die Zellen wiesen nach F(ab')-Dy-Inkubation zwar schwach signifikant höhere Messwerte auf im Vergleich zu ihren Negativkontrollen, aber die Werte sind weitaus niedriger als vergleichbare LS174T-Zellwerte nach Inkubation mit spezifischem antiCEA-F(ab')-Dy bei gleichen Versuchsbedingungen (Daten Frau Annika Görmer, ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena): mittlere Fluoreszenzintensität = 201 ± 47 vs. 1719 ± 88 bei LS174T-Zellen). Dies spricht eindeutig für *spezifische* Wechselwirkungen der CEA-exprimierenden LS174T-Zellen mit dem antiCEA-F(ab')-Dy und die schwach signifikant höheren Messwerte der F(ab')-Dy inkubierten Zellen stehen am ehesten für nach der Waschung zurückgebliebene Sondenreste.

Weiterhin bestand eine schwach signifikante Fluoreszenzerhöhung der LS174T-Zellen im Vergleich zu den A375-Zellen nach F(ab')-Dy-Inkubation bei Auswertung der Fluoreszenzwerte und auch die Autofluoreszenzwerte der LS174T-Zellen waren, wenn auch nicht signifikant, etwas höher als die

A375-Werte. Solch eine erhöhte natürliche Fluoreszenz kann Zeichen gesteigerter Stoffwechselaktivität sein, wie sie in dysplastischem Gewebe zu finden ist (Bornhop et al. 2001, Wagnières et al. 1998). Bekannt ist bereits, dass Kolonkarzinomzellen - wie die LS174T-Zellen - eine rote Eigenfluoreszenz besitzen. Die hier dominanten natürlichen Fluorophore sind Protoporphyrine als Vorläufer der Atmungsketten-Cytochrome. Das Emissionsspektrum dieser Moleküle liegt zwischen 600 und 725 nm mit Peak bei 630 nm und 700 nm (Moesta et al. 2001) und interferiert demzufolge direkt mit dem Emissionsspektrum des Dy-676 (Absorptionsmaximum bei 674 nm). Die deutlich gesteigerte Stoffwechselaktivität der LS174T-Zellen trägt somit zum einen zu einer erhöhten Autofluoreszenz der Zellen bei, zum anderen zu einer erhöhten Fluoreszenz nach Kontrastmittellinkubation durch Interferenz mit dem Emissionsspektrum des Dy-Farbstoffes.

In der CLSM-Analyse zeigte sich eine extrem schwache, kaum erkennbare randständige Färbung beider Zelllinien nach F(ab')-Dy-Inkubation. Die Sonde scheint sich also in sehr geringen Mengen an die Zellmembran anzulagern, jedoch nicht intrazellulär aufgenommen zu werden. F(ab') als unspezifisches Antikörperfragment dürfte keine *spezifischen* Interaktionen mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen eingehen. Wahrscheinlicher sind *unspezifische* Wechselwirkungen des Dy-Farbstoffes mit der Zelloberfläche, beispielsweise mit den hier vorkommenden Proteinen. Bereits nachgewiesen wurde, dass es in polaren Lösungen zu einer cis-trans-Isomerisierung von Cyaninfarbstoffen und somit zur Erhöhung der Quantenausbeute kommt (Serpone und Sahyun 1994, Mishra et al. 2000). Eben solche Interaktionen sollten demnach auch mit anderen geladenen Molekülen, d. h. theoretisch auch mit Proteinen oder Glykoproteinen auf der Zelloberfläche möglich sein. Für BSA, Fetales Kälberserum (FCS - *engl.* Fetal Calf Serum) und IgG konnten solche Anlagerungen bereits nachgewiesen werden. Hier wurden elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem jeweiligen Protein und Cyaninfarbstoffen in Lösung verantwortlich gemacht (Pauli et al. 2009, Pauli et al. 2010, Hamann et al. 2010). Der Dy-676 weist beispielsweise aufgrund seiner vielen Sulfonsäuregruppen und der hohen Hydrophobizität eine hohe Affinität zu BSA auf (18 mal höher als z. B. Dy-678 oder Dy 675) (Hamann et al. 2010).

Eine fehlende *spezifische* Anlagerung des F(ab')-Dy an die Tumorzellen konnte hingegen auch *in vivo* bestätigt werden. Hier zeigt sich im Gegensatz zu den *in vitro*-Versuchen eine etwas stärkere Fluoreszenz des A375-Tumors im Vergleich zum LS174T-Tumor, was hauptsächlich auf eine Mehrdurchblutung durch ausgeprägte Mikrozirkulation des ersteren Karzinoms zurückzuführen ist. Jünger et al. wiesen chaotische inhomogene Gefäßanordnungen, korkenzieherartige Kapillarveränderungen mit glomerulumentartigen Formationen und randständige Hypervaskularisationen mit Dilatationen und Kaliberschwankungen in kutanen Melanomen, wie der A375-Tumor, beim Menschen nach (Jünger et al. 1999). Sie konnten ebenfalls die damit verbundene Mehrdurchblutung des Melanoms im Vergleich zu gesunder Haut mittels Laser-Doppler-Flux-Messungen aufzeigen. Im Gegensatz dazu wird für das Kolonkarzinom mit steigendem Durchmesser eine abnehmende Durchblutung proklamiert (Holm 2007). Auch im Vergleich zu bereits in der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie Jena erstellten Daten von Frau Annika Görmer (ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena) ist deutlich zu erkennen, dass hier keine spezifische Anreicherung vorliegen kann: Es wurden deutlich höhere Relativwerte des LS174T-Tumors 24 h nach Injektion von spezifischem antiCEA-F(ab')-Dy als in beiden Tumoren 24 h nach Injektion von F(ab')-Dy gefunden (mittlerer Relative Fluoreszenzintensität nach anti-CEA-F(ab')-Dy-Injektion = $11,71 \pm 1,80$ für LS174T-Tumor vs. $4,54 \pm 0,52$ für LS174T-Tumor bzw. $4,75 \pm 0,51$ für A375-Tumor nach F(ab')-Dy-Injektion). AntiCEA-F(ab')-Dy geht demzufolge *spezifische*

Interaktionen mit den CEA-exprimierenden LS174T-Zellen ein, während F(ab')-Dy sich lediglich unspezifisch durchblutungsabhängig in den Tumoren verteilt. Diese Theorie wird durch den ähnlichen Zeitverlauf der Fluoreszenz in den Tumoren bestätigt. Obwohl der A375-Tumor eine etwas höhere Fluoreszenz aus den oben genannten Gründen aufweist, finden sich bei der statistischen Auswertung dennoch überhaupt keine signifikanten Unterschiede in der Relativen Fluoreszenzintensität. Im Gegenteil weisen beide Tumoren sogar stark ähnliche Werte auf ($p = 1,0$).

In beiden Karzinomen sind 2 h nach Injektion des F(ab')-Dys Unterschiede zum Nativwert erkennbar. Dies bedeutet, dass vor diesem Zeitpunkt eine fluorooptische Messung in beispielsweise klinischer Anwendung nicht sinnvoll wäre, da erst danach die Sonde in ausreichendem Maße anflutet, um die Fluoreszenz der Tumoren zu erhöhen. Nach diesem Zeitpunkt könnten bei Einsatz einer *spezifischen* Sonde wie beispielsweise der antiCEA-F(ab')-Sonde auch *spezifische* Bindungen sichtbar werden. Der Grund hierfür ist, dass erst nach diesem Zeitpunkt ein Abfluten der *unspezifischen* F(ab')-Sonde zu erkennen ist, d. h. dass erst nach diesem Zeitpunkt bei Einsatz einer *spezifischen* F(ab')-Sonde nichtgekoppelte Sondenmoleküle aus den Tumoren ausgewaschen werden würden. Für die Praxis bedeutet dies, dass eine fluorooptische Bildgebung mit spezifischen F(ab')-Sonden erst nach 8 h sinnvoll wäre, da es vorher unmöglich wäre, gebundene und ungebundene Liganden zu unterscheiden (Weissleder 2001).

Diese Vermutung bestätigt sich nach Betrachten der von Frau Annika Görmer (ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena) erhobenen Daten zum spezifischem antiCEA-F(ab')-Dy. 8 h nach Injektion der Sonde zeigte sich hier bei gleichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit die stärkste Fluoreszenz sowohl im LS174T- wie auch im A375-Tumor. Im Zeitraum zwischen 8 und 24 h war die Fluoreszenzerhöhung des LS174T-Tumors im Vergleich zum A375-Tumor am ausgeprägtesten. Dies bedeutet, nach 8 h konnten die spezifischen Wechselwirkungen der antiCEA-F(ab')-Dy-Sonde mit den CEA-exprimierenden LS174T-Tumorzellen *in vivo* bildgebend nachgewiesen werden. Im Vergleich zu beispielsweise Cy5.5-gelabelten HER-2-Antikörpern für die Bildgebung von Her-2-überexprimierenden Brustkrebstumoren bedeutet dies eine deutliche Verbesserung, denn mit dieser Methode konnten Hilger et al. erst nach 16 h spezifische Bindungen nachweisen (Hilger et al. 2004). Auch von nuklearmedizinischen antiCEA-Sonden ist bekannt, dass IgG-Sonden eine sehr viel längere Verteilungs- bzw. Anreicherungszeit haben als entsprechende antiCEA-F(ab')-Fragmente (4 h vs. 24 h) (Behr et al. 1995). Die Trägheit des IgG und die bessere Penetration des F(ab') in die Gewebe bestätigt sich somit auch für fluorooptische Sonden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus den *in vivo*-Untersuchungen stellt die erhöhte Autofluoreszenz des Muskels im Vergleich zu den Tumoren dar. Da der Muskel einen hohen Energiestoffwechsel besitzt ist auch dieses Gewebe reich an Porphyrinen. Aus diesem Grund findet sich auch hier eine hohe Autofluoreszenz um 630 nm (siehe oben) (Wagnières et al. 1998). Es bestätigt sich somit die anfängliche Annahme, dieses Gewebe eigne sich besonders als Referenzgewebe für andere, sondenaufnehmende Gewebe, da eine Mehranreicherung fluorooptischer Sonden in verschiedenen anderen Organen und Strukturen signifikant höhere Fluoreszenzen aufweisen sollte als das stark fluoreszierende Muskelgewebe - um eine sichere Abgrenzbarkeit zwischen Autofluoreszenz und durch fluorooptische Kontrastmittel hervorgerufene, d. h. induzierte Fluoreszenz zu erreichen (siehe 4.6.3). Nach Gabe von F(ab')-Dy zeigt sich beispielsweise zu allen Zeitpunkten eine schwächere Muskelfluoreszenz als in den Tumoren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Tumoren weitaus besser durchblutet werden als das Muskelgewebe.

In den *ex vivo*-Versuchen zeigte sich nach 24 h kaum noch eine Anreicherung der F(ab')-Sonde in den entnommenen Geweben. Lediglich die Leber fluoreszierte ebenso wie bei den Versuchen zum antiCEA-F(ab')-Dy (Daten von Frau Annika Görmer, ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena) deutlich, während die Niere die zweitstärkste Fluoreszenz aufwies. Hier finden sich somit Hinweise auf eine überwiegend hepatische Elimination der Sonde, obwohl die Niere ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße beteiligt zu sein scheint. Diese Erkenntnisse widersprechen den von Covell et al. proklamierten Abbauweg für radiogekoppelte, unspezifische F(ab')-Fragmente, welche hauptsächlich renal katabolisiert werden (Covell et al. 1986). Der Dy-Farbstoff muss demzufolge einen großen Einfluss auf die Elimination der F(ab')-Sonden haben. Es wird eine hepatische Metabolisierung für diese Substanz angenommen, denn auch ungebunden als freie Säure reichert sich der Dy-676 stark in Leber an (Hamann et al. 2010). Eine solche Anreicherung ist ebenfalls über fluorochrome IgG-Sonden bekannt (Ballou et al. 1997, Hilger et al. 2004, Zou et al. 2009). Vorstellbar wäre somit zunächst die Metabolisierung des F(ab')-Dy in der Leber und anschließend eine renale Exkretion von kleinen F(ab')-Metaboliten (Cystin-Peptiden), wie es so auch für nukleare F(ab')-Sonden beschrieben wird (Behr et al. 1995). Die erhöhte Fluoreszenz der Niere würde sich somit erklären.

Auffällig ist weiterhin, dass die beiden Tumoren LS174T und A375 *ex vivo* sehr niedrige Fluoreszenzen aufwiesen. Da die Tumoren nach Entnahme aus dem Organismus ausgeblutet waren, bestätigt sich die bereits *in vitro* und *in vivo* erstellte These, die Fluoreszenz der Tumoren nach F(ab')-Dy-Injektion sei lediglich durchblutungsabhängig und es können keinerlei spezifische Bindungen nachgewiesen werden. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die annähernde Gleichheit der Fluoreszenzmesswerte in den beiden Tumoren. Es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Betrachten der Daten von Frau Annika Görmer (ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena) eine weitaus höhere *ex vivo*-Fluoreszenz des CEA-exprimierenden LS174T-Tumors 24 h nach antiCEA-Dy-Injektion. Dies bedeutet, dass die hier untersuchten *spezifischen* Bindungen auch nach Organentnahme noch nachweisbar waren.

In Zusammenschau der vorangegangenen Erkenntnisse konnte die F(ab')-Sonde erfolgreich und gut verträglich im Tierversuch eingesetzt werden und der Beweis ihrer Unspezifität wurde *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* erbracht. Dies ermöglichte den weiteren Einsatz der Sonde und ihrer in Bezug auf die Spezifität bzw. Affinität gleicher „Familienmitglieder“ F(ab')₂-Dy und IgG-Dy für die folgende Untersuchung der unspezifischen Verteilung im Organismus.

6.3 Pharmakokinetische *ex vivo*-Untersuchungen

6.3.1 Blutuntersuchungen

Die Sonden F(ab')₂-Dy und F(ab')-Dy weisen nach Injektion in gesunde *NMRI*-Mäuse laut den pharmakokinetischen Blutuntersuchungen eine ähnliche Kinetik auf: Sofort nach Injektion wird das Blutmaximum erreicht, danach erfolgt die Verteilung der Sonden in den Geweben. Es fällt bei Betrachtung der RFI-Zeitpunkt-Kurven (siehe Abschnitt 5.6.1, Abbildung 36) ein zunächst starker Abfall der Blutfluoreszenz, d. h. der Sondenkonzentration, auf. Dies kann auf eine schnelle Verteilung in den Geweben zurückgeführt werden. Daraufhin folgt eine langsamere Konzentrationsabnahme, weil die Gewebe bereits mit den Sonden „aufgefüllt“ bzw. „gesättigt“ sind. F(ab')-Dy zeigt trotz dieser Ähnlichkeiten zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigere Fluoreszenzwerte als F(ab')₂-Dy. Dies entspricht

den Erkenntnissen von Covell et al. und Behr et al. zu nuklearen, unspezifischen $F(ab')_2$ - und $F(ab')_2$ -Sonden (Covell et al. 1986, Behr et al. 1995). Auch hier wurde eine sehr schnelle Verteilung und damit niedrige Blutkonzentration des $F(ab')$ aufgedeckt, während $F(ab')_2$ sich langsamer verteilte. Auch hier zeigten die Blutkonzentrationskurven einen annähernd ähnlichen Verlauf. Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Plasma-Clearance-Rate von körperfremden Molekülen mit fallendem Molekulargewicht steigt (Behr et al. 1995), wie durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Blutuntersuchungen somit bestätigt werden konnte.

Die Konzentration bzw. Blutfluoreszenz des IgG-Dy steigt im völligen Gegensatz dazu und wider allen Erwartungen langsam bzw. kontinuierlich im Blut an und erreicht frühestens 4 h nach Injektion der Sonde das Maximum. Erst danach nähert sie sich der Fluoreszenz der $F(ab')_2$ -Sonde an. Dies widerspricht gänzlich den Erkenntnissen von Covell et al., laut denen die Konzentration von Tc^{99m} -gekoppeltem IgG sofort nach Injektion in den Blutkreislauf das Maximum im Blut erreicht und daraufhin sehr langsam und kontinuierlich abnimmt - langsamer als $F(ab')$ und $F(ab')_2$ (Covell et al. 1986). Zu vermuten ist hierbei, dass der Dy-Farbstoff einen erheblichen Einfluss auf die Blutkinetik der IgG-Sonde nimmt. Vorstellbar wäre beispielsweise, dass die Sonde sofort nach Injektion „abgefangen“ bzw. „herausgefiltert“ wird und vom entsprechenden „Filtergewebe“ aus kontinuierlich ins Blut freigesetzt wird. In Frage als solch ein Filtergewebe kommen vor allem Leber und Milz, da hier eine hohe kapilläre Permeabilität durch die dort vorkommenden Sinusoide gewährleistet wird (Covell et al. 1986, Wang et al. 2008). In allen anderen Geweben können biologische Barrieren schlecht von kompletten Antikörpern überwunden werden (Batra et al. 2002). Ballou et al. zeigten beispielsweise, dass die ersten Organe, die nach Injektion von Cyaninegekoppelten Antikörpern eine starke Fluoreszenzaufnahme aufweisen, Leber und Milz sind (Ballou et al. 1997). Daraufhin folgten Gallenblase und später das Intestinum. Sie vermuteten deshalb, dass große Mengen der gekoppelten Antikörper sehr schnell von der Leber katabolisiert werden und die abgespaltenen Fluorochrome in die Gallenblase und schließlich in den Darm eliminiert werden. Vom Darm aus erfolgte schließlich die Reabsorption der biliär ausgeschiedenen Fluorochrome (enterohepatischer Kreislauf). Eine solche Reabsorption der Fluorochrome könnte auch bei den vorliegenden Versuchen den kontinuierlichen Fluoreszenzanstieg im Blut nach Injektion der IgG-Sonde erklären. Gleichzeitig ist jedoch auch eine kontinuierliche Freisetzung der abgefangenen Sondenmoleküle aus der Milz vorstellbar. Die Milz gilt als Abfangorgan für Antigen-Antikörper-Komplexe. Somit könnte es möglich sein, dass sie auch konjugierte Antikörper aus dem Blut herausfiltert, denn, wie bereits beschrieben, neigen Cyanin-gekoppelte Antikörper zu Dy-Dy-Aggregationen. Auch für nukleare IgG-Sonden konnte eine sehr hohe Extraktionsrate der Milz nachgewiesen werden (Covell et al. 1986), sodass diese Annahme durchaus unterstützt würde. Betrachtet man zusammenfassend die unterschiedlichen Kinetiken der IgG- sowie der $F(ab')_2/F(ab')$ -Sonden, so lassen sich folgende Aussagen treffen: Erst nach dem Konzentrations- bzw. Fluoreszenzmaximum der Sonden im Blut ist eine gleichmäßige Verteilung der Sonden in den Geweben möglich. Erst nach der gleichmäßigen Verteilung im Gewebe mit anschließender Elimination ist es wie bereits erwähnt sinnvoll, bei Verwendung einer *spezifischen* Sonde eine bildgebende Darstellung der Zielgewebe durchzuführen, da erst dann die Differenzierung zwischen gebundenen und ungebundenen Farbstoffmolekülen möglich ist (Weissleder 2001). Bei Verwendung *spezifischer* IgG-Sonden ist es somit erst sehr viel später als 4 h nach Injektion sinnvoll, fluorooptische Messungen durchzuführen, was die bisherigen Erfahrungen mit fluorochromen Antikörper-Sonden zur Detektion von Tumoren bestätigt (Hilger et al. 2004, Zou et al. 2009). Da $F(ab')_2$ - und $F(ab')$ -Dy sich offensichtlich weitaus schneller in den Geweben verteilen, ist nun zu erwarten, dass fluorooptische Messungen bei diesen

Sonden schon weitaus früher sinnvoll durchführbar sind.

6.3.2 Organuntersuchungen

Bei Auswertung der Organmesswerte im nativen Zustand, d. h. vor Sondeninjektion, fiel auf, dass vor allem der Magen eine sehr hohe Autofluoreszenz aufwies und auch der Dickdarm stark fluoreszierte. Vergleichbar hiermit fanden auch Ke et al. erhöhte Autofluoreszenzen im nativen murinen Abdominal-/Eingeweidebereich (Ke et al. 2003). Sie schrieben dies der Maus-Nahrung zu. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine Pheophorbid-arme Diät als alleiniges Nahrungsmittel für die *NMRI*-Mäuse gewählt wurde, konnten die erhöhten Autofluoreszenzen demzufolge nicht vollständig vermieden werden. Es scheint hier also nötig, bessere Nahrungsmittel zu entwickeln oder gar den Mäusen bzw. in der späteren klinischen Anwendung den Patienten vor dem Bildgebungstermin eine Nahrungskarenz zu verordnen. Vorstellbar wäre auch die auf beispielsweise viszeralchirurgischen Stationen tagtäglich durchgeführte Abfuhr des Darminhalt mittels Prokinetika. Dadurch würde voraussichtlich entscheidend zur Qualitätsverbesserung der fluorooptischen Bildgebung im Gastrointestinalbereich beigetragen.

Die Lunge erschien in der Auswertung der nativen Fluoreszenzmesswertes als drittstärkstes autofluoreszentes Organ. Dies könnte möglicherweise auf das große Vorkommen am natürlichen Fluorophor Elastin in diesem Organ zurückgeführt werden. Bereits in der Immunofluoreszenz-Mikroskopie, die ebenfalls fluorooptische Methoden verwendet, ist dies als störendes Problem bekannt (van de Lest et al. 1995). Eine denkbare Lösung hierfür wäre die Nutzung von fluorooptischen Sonden zur Darstellung von pulmonalen Prozessen, die zum einen nicht mit der Emissionswellenlänge des Elastins interferieren und zum anderen so spezifisch sind und eine so hohe Quantenausbeute besitzen, dass die Autofluoreszenz vernachlässigbar klein im Vergleich zur spezifischen Fluoreszenz der Sonde wird.

Nach Injektion der hergestellten fluorooptischen Sonden in die *NMRI*-Mäuse wurden deutliche Unterschiede in der Organverteilung von IgG-, F(ab')₂- und F(ab')-Dy erkennbar. Nach IgG-Dy-Injektion stieg die Fluoreszenz beispielsweise sehr schnell und stark in Leber und Dünndarm an. Vermutlich ist dies, wie in Abschnitt 6.3.1 bereits beschrieben und durch Ballou et al. bekanntermaßen proklamiert, auf ein „Abfangen“ der injizierten Sonde durch die Leber und die schnelle Ausscheidung fluoreszenter Moleküle in den Dünndarm über die Galle zurückzuführen (Ballou et al. 1997). Die daraufhin folgende langsame Rückresorption fluoreszenter Verbindungen aus dem Dünndarm ins Pfortaderblut über den sogenannten enterohepatischen Kreislauf wäre am ehesten vereinbar mit der langsam ansteigenden Fluoreszenz im Blut (siehe 5.6.1). Diese kontinuierliche, verzögerte Blutkinetik lässt sich am besten mit einer typischen Resorptionskinetik vergleichen, nicht aber mit der gewöhnlichen Kinetik nach i.v.-Injektion (Mutschler et al. 2008). Die „Resorptionstheorie“ wäre ebenfalls vereinbar mit dem starken Absinken der Dünndarmfluoreszenz zwischen 1 und 6 h nach IgG-Dy-Injektion und dem gleichzeitig starken Fluoreszenzanstieg im Dickdarm, da die nichtresorbierten Fluoreszenzmoleküle hierhin weitertransportiert werden.

Überdies beschrieben auch die Arbeitsgruppen um Hilger et al. und Zou et al. eine starke Anreicherung fluorochromgekoppelter Antikörper in Leber. Zou et al. erklärten dies mit der bekannten Metabolisierung von IgG-Antikörpern im Retikuloendotheliale System (RES) durch die dort ansässigen Kupffer-Zellen (in Leber und Milz) sowie durch die in der Leber vorhandenen Parenchymzellen. Sie binden die Immunglobuline und internalisieren sie über Asialoglykoprotein-Rezeptoren (Mohsin

et al. 2006) und Fc- γ -Rezeptoren. Dieser Prozeß wird wahrscheinlich durch die Aggregationsneigung der IgG-Dy-Vebindungen gefördert, denn der Fc- γ -Rezeptor-vermittelte Abbau wird durch Antikörper-Komplexe aktiviert. Es erfolgt demzufolge keine Ausscheidung der Antikörper über die Galle, sondern eine zelluläre Verdauung (Wang et al. 2008). Ein solcher Antikörperverschleiss unterstützt auch die Hypothese des zweiten Abfangortes Milz für die IgG-Sonden. Befürwortend dafür ist ebenfalls der in dieser Arbeit gezeigte schnelle und maximale Fluoreszenzanstieg in der Milz bereits 1 h nach IgG-Dy-Injektion.

Zusammenfassend kann man diese Hypothese folgendermaßen beschreiben: Ein nicht unerheblicher Teil der IgG-Dy-Sonde wird sofort nach i.v.-Injektion durch Leber und Milz „abgefangen“. Dort erfolgt durch zelluläre Vorgänge in Hepatozyten und Kupffer-Zellen die Abspaltung und Metabolisierung der IgG-Moleküle von dem Fluorochrom. Die recht hydrophoben Dy-Moleküle werden daraufhin, wie von Hamann et al. beschrieben, über die Galle ausgeschieden (Hamann et al. 2010), gelangen in den Verdauungstrakt, speziell den Dünndarm, und werden von dort aus zum Teil reabsorbiert und zum Teil für die fäkale Ausscheidung weiter in den Dickdarm transportiert. Die reabsorbierten Fluorochrome gelangen ins Blut und sorgen für einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz.

Die Hypothese des „Abfangens“ und der Dy-Abspaltung erklärt möglicherweise auch den recht schnellen Abfall der Plasmakonzentration von IgG-Dy auf das F(ab')₂-Dy-Level, der im Gegensatz zur bereits bekannten Kinetik nuklearer Antikörper-Sonden steht. Da das IgG normalerweise durch FcRn-Rezeptor (Brambell-Rezeptor) auf verschiedenen Zellen gebunden, endozytiert und recycelt, d. h. wieder ins Plasma exozytiert, wird, besitzen nukleare IgG-Sonden eine enorm lange, über mehrere Tage dauernde Plasma-Halbwertszeit (Vaccaro et al. 2005, Wang et al. 2008).

Die restlichen, nach IgG-Dy-Injektion entnommenen Organe fluoreszieren nur gering. Dies bestätigt die bekannte These, dass Immunglobulin G aufgrund seines großen Molekulargewichts schlecht in Gewebe diffundieren könne (Covell et al. 1986, Jain und Batra 2003). In gleichem Atemzug wird oft die zu vernachlässigende Elimination der Antikörpermoleküle über die Niere genannt (Wang et al. 2008), wie sie sich auch durch die Datenlage der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Zusammenfassend bietet die IgG-Dy-Sonde wie erwartet eine sehr komplexe Pharmakokinetik, die zum einen durch die zahlreichen bekannten zellulären Interaktionen des IgG, zum anderen durch die pharmakokinetischen Eigenschaften des Dy-Farbstoffs beeinflusst wird.

Auffällig bei Betrachten der Organdiagramme des F(ab')₂-Dy ist das Auftreten der Fluoreszenzmaxima aller Organe außer Magen und Dünndarm bereits 1 h nach Sondeninjektion. Sie folgen somit dem Blutmaximum. Dies spricht für eine rasche Verteilung der Sondenmoleküle in den Organen, was auf eine bessere Diffusion ins Gewebe zurückzuführen sein könnte. Laut Covell et al. trifft dies auch für nukleare F(ab')₂-Sonden zu. Der darauffolgende schnelle Abfall der Organfluoreszenzen stimmt ebenfalls mit den Erkenntnissen dieser Arbeitsgruppe überein, laut derer die mittlere Gewebeverweildauer von Tc^{99m}-gekoppeltem F(ab')₂ im Vergleich zum ungespaltenen IgG 17fach erniedrigt sein soll (Covell et al. 1986). Ins Auge fällt auch eine auf die F(ab')₂-Dy-Injektion folgende, starke Fluoreszenz der Niere, während die Leber nur mittelstarke Fluoreszenzen aufweist. Dies stimmt überein mit dem in der Literatur proklamierten, hauptsächlich renalen Abbauweg des F(ab')₂. Auch eine weniger starke hepatische Metabolisierung soll demzufolge stattfinden, jedoch durch unspezifische Mechanismen und nicht wie beim IgG über spezielle Rezeptoren (Covell et al. 1986, Behr et al. 1995, Nelson und Reichert 2009).

Der Einsatz *spezifischer* fluorooptischer F(ab')₂-Sonden für die molekulare Bildgebung wäre somit

im Gegensatz zum IgG-Dy gut vorstellbar bei leberkranken Patienten, da die Sondenmoleküle im Vergleich zu den großen Antikörpersonden schnell aus der Leber abfluten, nicht retiniert werden und spezifische Bindungen im Folgenden gut sichtbar werden können. Sinnvoll wäre beispielsweise eine Bildgebung hepatischer Tumore und Metastasen. Renale Prozesse könnten allerdings schlechter dargestellt werden, da die aufgrund der Sondenelimination entstehende, erhöhte Fluoreszenz die Darstellung spezifischer Bindungen stärker überlagern würde als bei Verwendung der hepatisch eliminierten IgG-Sonde.

Zunächst verwirrend erscheint das frühe Fluoreszenzmaximum des Dickdarms nach Injektion von $F(ab')_2$ -Dy, welches noch vor dem Dünndarmmaximum auftritt. Dies spricht eher für eine durchblutungsabhängige als für eine intraluminale Anhäufung der Sonde, da die Sondenmetabolite zunächst den Dünndarm passieren müssten und da das Kolon durch mehrfache Gefäßversorgung aus oberer und unterer Mesenterialarterie ein sehr gut durchblutetes Organ ist. Das tatsächliche Fluoreszenzmaximum des Dünndarms liegt höchstwahrscheinlich zwischen den Zeitpunkten 1 und 6 h nach Sondeninjektion, direkt folgend dem Fluoreszenzmaximum der Leber durch die z. T. vorhandene hepatische Ausscheidung der Sonde.

Der Magen zeigt neben dem Dünndarm ebenfalls einen eher langsamen Anstieg der Fluoreszenz und bleibt kontinuierlich auf niedrigem Messwertlevel. Dies ist am ehesten bedingt durch eine Überlagerung der enormen Autofluoreszenz dieses Organs.

Die $F(ab')$ -Dy-Sonde weist trotz im Vergleich zum IgG-Dy völlig unterschiedlicher Blutkinetik eine ähnliche Organkinetik wie die Antikörpersonde auf. Dennoch scheint die $F(ab')$ -Sonde weitaus besser in die Gewebe zu diffundieren, da die Fluoreszenzwerte im Vergleich zum IgG-Dy vor allem in den Organen erhöht war, in denen die Anreicherung der Sonde vor allem durchblutungsabhängig war. Dies betraf beispielsweise die muskulären Organe Herz und Muskel. Die Organmaxima folgten jedoch größtenteils nicht den Blutmaxima, wie dies bei der $F(ab')_2$ -Dy-Sonde erkennbar war. Diese Datenlage ist völlig widersprüchlich zu den Erkenntnissen von Covell et al. zu nuklearen $F(ab')$ -Sonden. Laut derer dringt $F(ab')$ noch schneller als $F(ab')_2$ in die Gewebe ein und wird zweimal schneller von dort eliminiert (Covell et al. 1986). Andererseits entspricht es aber den Erkenntnissen über die spezifische AntiCEA- $F(ab')$ -Sonde von Frau Annika Görmer (ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena). Auch hier wurden erst nach 8 h spezifische Bindungen an CEA-tragende LS74T-Tumoren signifikant nachweisbar. Der Dy-Farbstoff scheint somit einen enormen Einfluss auf die Kinetik der $F(ab')$ -Dy-Sonde zu nehmen. Diese fluorochromspezifischen Auswirkungen kommen höchstwahrscheinlich aufgrund der hohen Substitutionsrate (Farbstoff-Protein-Verhältnis) der $F(ab')$ -Dy-Sonde im Vergleich zur $F(ab')_2$ -Dy-Sonde zum Tragen. Der hydrophobe, sulfonsäurearme Dy-676 wird beispielsweise wie bereits beschrieben hauptsächlich über die Leber eliminiert und nur zum kleinen Teil über die Niere (Hammann et al. 2010), wie dies auch für die $F(ab')$ -Dy-Verbindung zutrifft. Im Gegensatz dazu werden radiogekoppelte $F(ab')$ -Fragmente fast ausschließlich über die Niere eliminiert (Covell et al. 1986). Denkbar wäre somit, im Gegensatz zum $F(ab')_2$ -Dy, ein Einsatz *spezifischer* $F(ab')$ -Sonden zur molekularen Bildgebung bei niereninsuffizienten Patienten, da hierbei nicht die Gefahr einer Retention der Sonde entstünde. Auch Nierentumore könnten beispielsweise gut dargestellt werden, da die Sonde schnell aus dem Organ abflutet und spezifische Bindungen somit gut darstellbar wären. Hepatische Prozesse wären allerdings aufgrund der Überlagerung des Signals durch die Eliminationsprozesse schlecht darstellbar.

Auch die erhöhten Fluoreszenzen von Milz und Lunge nach $F(ab')_2$ -Dy-Injektion im Vergleich zu $F(ab')_2$ - und IgG-Dy sind möglicherweise durch den Einfluss des Dy-Farbstoff bedingt, denn auch hier zeigt dieser - in freier Form injiziert - erhöhte Fluoreszenzen z. B. im Vergleich zum muskulären Organ Herz (Hamann et al. 2010). Nukleare $F(ab')$ -Sonden hingegen weisen weitaus niedrigere Aktivitäten in diesen Organen im Vergleich zu nuklearen $F(ab')_2$ - und IgG-Sonden auf (Covell et al. 1986).

Gemeinsam ist allen drei Sonden, dass in sämtlichen Verdauungsorganen teilweise sehr starke Schwankungsbreiten der Messwerte auftraten (große Standardfehler). Dies kann zum einen auf die bereits erwähnte Interferenz der Fluoreszenz von Nahrungsbestandteilen (Ke et al. 2003) zurückgeführt werden. Zum anderen hängt die Durchblutung und auch der intraluminale Weitertransport von der Verdauungsaktivität des Organismus ab. Stress, dem die Versuchstier während der Versuche, vor allem aber während der Sondeninjektion, unweigerlich ausgesetzt sind, hat hier beispielsweise einen enormen Einfluss. Die Magenentleerung wird inhibiert, der Kolontransit hingegen stimuliert und somit auch die Dickdarmdurchblutung angehoben (Mönnikes et al. 2001). Dies erklärt die starke Fluoreszenz des Dickdarms zum einen, zum anderen warum der Magen nach Injektion von $F(ab')_2$ - und IgG-Dy solch eine paradoxe Kinetik mit Fluoreszenzabfall nach 6 h und Fluoreszenzanstieg nach 24 h aufweist: Die Durchblutung wird über Stunden erniedrigt als Folge des Stresses, um nach längerer Erholung wieder angeregt zu werden.

Eine weitere Gemeinsamkeit aller 3 Sonden ist die Tatsache, dass die Fluoreszenz weder in den Blutproben noch in den einzelnen Organen nach 24 h vollständig auf das Nativniveau abgefallen war. Dies bedeutet, dass die fluorochromen Sonden am Ende des Experiments noch im Abbau begriffen waren und die vollständige Elimination noch nicht erfolgt war. Zumindest fluoreszente Metabolite müssen sich zu diesem Zeitpunkt noch im Organismus der Mäuse befunden haben. Die Leber wies beispielsweise eine recht hohe, vom Nativwert verschiedene Fluoreszenz für alle 3 Sonden auf, nach Injektion von $F(ab')_2$ -Dy betraf dies auch die Niere. Von nuklearen Sonden ist für IgG eine mittlere Verweildauer im Organismus von 8,3 Tagen, für $F(ab')_2$ jedoch nur von 0,5 Tagen (12 h) und für $F(ab')$ sogar nur von 0,24 Tagen (unter 6 h) bekannt. Die mittlere Verweildauer in der Leber beträgt für IgG 21 h, für $F(ab')_2$ 1 h und für $F(ab')$ gar nur 18 min. Die mittlere Verweildauer in der Niere für $F(ab')_2$ beträgt ebenfalls nur 22 min (Covell et al. 1986). Es zeigt sich also, dass der Dy-Farbstoff einen enormen Einfluss auf die Kinetik aller drei, in dieser Arbeit untersuchten fluorooptischen Sonden besitzen muss. Insbesondere verzögert er vor allem den Abbau der kleinemolekularen Antikörperfragmentsonden im Vergleich zu entsprechenden nuklearen Sonden, deren gekoppelte Radionuklide ein weitaus niedrigeres Molekulargewicht als die Dy-676-Moleküle besitzen. Aufgrund dessen haben Radionuklide keinen nennenswerten Effekt auf die Metabolisierung nuklearer Sonden, während sich die Metabolisierung der fluorochromgekoppelten Sonden deutlich verzögert. Diese Erkenntnis wird bestätigt durch die Daten von Laabs et al.. Sie wiesen beim Nachweis des Cholecystokinin2/Gastrin-Rezeptors mittels des hemicyaninegekoppelten Peptid DY-Minigastrin ebenfalls eine deutliche Verzögerung des Sondenabbaus im Vergleich zu gleichartigen nuklearen Sonden nach (Laabs et al. 2010).

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einen nachweisbaren Einfluss des Molekulargewichts fluoroptischer Sonden auf die Pharmakokinetik ebendieser aufzeigen. Bei Verwendung des kleinemolekularen $F(ab')_2$ -Dy wurde im Vergleich zum großmolekularen IgG-Dy deutlich, dass sowohl die Biodistribution der Sonde im Organismus als auch die nachfolgende Metabolisierung weitaus schneller abliefen. Die Metabolisierungswege zeigten eine Verschiebung von hepatisch in Richtung renal. Dies steht im Einklang mit den in der Literatur vorhandenen Daten zu nuklearen $F(ab')_2$ -Sonden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch bei Verwendung der noch kleinemolekularen $F(ab')$ -Dy-Sonde, dass der gekoppelte Hemicyaninfarbstoff neben dem Molekulargewicht ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik fluoroptischer Sonden nehmen kann. Entgegen den in der Literatur beschriebenen Daten für radiogekoppelte $F(ab')$ -Fragmente offenbarte sich eine sehr träge Organkinetik, die der des IgG-Dys sehr ähnlich war, sowie eine hepatische Metabolisierung.

An diesem Punkt stellt sich nun die Frage, inwieweit der Einfluss des Farbstoffes umgangen werden kann. Es ist wichtig herauszufinden, ob bei Kopplung einer geringeren Dy-Menge, d. h. bei niedrigeren Farbstoff-Protein-Verhältnissen, dieser Einfluss abnimmt und die Pharmakokinetik der $F(ab')$ -Dy-Sonden sich der Pharmakokinetik nuklearer $F(ab')$ -Sonden annähert. Dies könnte eine noch schnellere Verteilung der Sonden im Organismus, als in der vorliegenden Arbeit für $F(ab')_2$ -Sonden gezeigt wurde, sowie die hauptsächlich renale Elimination mit sich bringen. Es stellt sich jedoch in diesem Zusammenhang die unumgängliche Frage, ob es möglich ist, trotz Reduktion des Farbstoff-Protein-Verhältnisses fluoroptischer $F(ab')$ -Sonden ein ausreichend starkes, detektierbares Signal für die fluoroptische Bildgebung molekularer Marker *in vivo* zu erhalten, d. h. ob eine ausreichende Sensitivität gewährleistet bleibt. Denkbar wäre beispielsweise, dass sich die günstige, schnelle $F(ab')$ -Kinetik und die Detektierbarkeit durch ausreichende Farbstoff-Substitution entgegengesetzt zueinander verhalten: Verändert sich die Kinetik in Richtung $F(ab')$ -Kinetik, verringert sich möglicherweise die Detektierbarkeit der Sonden und umgekehrt. Es ist an dieser Stelle jedoch vorstellbar, dass eine biochemische Modifikation der Struktur des fluorochromen Farbstoffes, z. B. durch Veränderung von Hydro- bzw. Lipophilie oder durch Substitution von Seitengruppen, den Einfluss auf die Sondenkinetik vermindern und die Detektierbarkeit erhöhen würde. Diese Fragen können jedoch nur durch weiterführende Experimente zu klären sein.

Unter den in der vorliegenden Arbeit hergestellten und untersuchten fluoroptischen Sonden erwies sich alles in allem das $F(ab')_2$ -Dy als zu favorisierende Sonde. Sie konnte wie die anderen Sonden auch in großer Menge und Reinheit hergestellt und zufriedenstellend mit dem Dy-Farbstoff substituiert werden. $F(ab')_2$ -Dy wies jedoch darüber hinaus noch weitere gewünschte Eigenschaften auf: eine schnelle Verteilung in den Geweben, im Gegensatz zum IgG-Dy Unabhängigkeit von *in vivo*-Interaktionen mit dem Bindungsmodul, kein „Abfangen“ durch ein unbekanntes Gewebe, im Gegensatz zum $F(ab')$ -Dy vernachlässigbarer Einfluss des Dy-Farbstoffes auf die Pharmakokinetik und rasche Elimination aus den Organen. Es ist somit vorstellbar, dass auch bei Verwendung *spezifischer* $F(ab')_2$ -Dy-Sonden ein schnell und gut detektierbares Signal entsteht. Demzufolge sollte in weiterführenden Experimenten mit bereits bekannten molekularen Markern wie CEA oder Her2/neu geprüft werden, ob spezifische $F(ab')_2$ -Sonden die Signalqualität, die Schnelligkeit der Signaldetektierbarkeit und den Mengenbedarf an eingesetzter Sonde tatsächlich positiv beeinflussen im Vergleich zu IgG- oder $F(ab')$ -Sonden. Erwies sich die $F(ab')_2$ -Sonde hierbei weiterhin als gut geeignet, so ist

es denkbar, spezifische Sonden für weitere vielfältige molekulare Marker, die für ebenjene Sonde erreichbar sind, herzustellen.

Die Erkenntnisse aus derartigen Experimenten können einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung schneller, hochsensitiver und kostengünstiger fluorooptischer Bildgebungstechniken zur Darstellung früher und frühester Stadien verschiedenster - beispielsweise entzündlicher, degenerativer oder karzinogener - Erkrankungen leisten.

Literaturverzeichnis

- Adam G, Luger P, Stark G. 2009. Physikalische Chemie und Biophysik. Fnfte Aufl. Springer-Verlag Berlin.
- Ale A, Sarantopoulos A, Freyer M, Soehngen E, Zientkowska M, Ntziachristos V. 2009. Hybrid System for Simultaneous Fluorescence and X-ray Computed Tomography. *IEEE Trans Med Imaging*.
- Ballou B, Fisher GW, Hakala TR, Farkas DL. 1997. Tumor detection and visualization using cyanine fluorochrome-labeled antibodies. *Biotechnol Prog*, 13(5):649–658.
- Batra SK, Jain M, Wittel UA, Chauhan SC, Colcher D. 2002. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol*, 13(6):603–608.
- Behr T, Becker W, Hannappel E, Goldenberg DM, Wolf F. 1995. Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')₂, and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with ^{99m}Tc: the role of metabolism and kinetics. *Cancer Res*, 55(23 Suppl):5777s–5785s.
- Bender R, Grouven U, Ziegler A. 2007. Varianzanalyse fr Messwertwiederholungen. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1:e61–e64.
- Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanoski BJ, Telford WG, Yue S, Liu J, Cheung CY, Chang W, Hirsch JD, Beechem JM, Haugland RP, Haugland RP. 2003. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem*, 51(12):1699–1712.
- Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem*, 136(1):175–179.
- Borchmann P, Riethmller G, Engert A. 2001. Monoklonale Antikrper: Entwicklung und klinische Perspektiven. *Internist (Berl)*, 42(6):803–4, 807–14.
- Bornemann C, Burggraef T, Heimbchel G, Hanisch FG, Winkels S. 2003. Fluorescence-labelled antigen-binding fragments (Fab) from monoclonal antibody 5F12 detect human erythropoietin in immunoaffinity capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem*, 376(7):1074–1080.
- Bornhop DJ, Contag CH, Licha K, Murphy CJ. 2001. Advance in contrast agents, reporters, and detection. *J Biomed Opt*, 6(2):106–110.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH. 2001. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology*, 221(2):523–529.
- Bremer C, Ntziachristos V, Weissleder R. 2003. Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications. *Eur Radiol*, 13(2):231–243.

- Brinkley M. 1992. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug Chem*, 3(1):2–13.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. 1995. Intravenöse Immunglobuline. Grundlagen, Auswahlkriterien und Indikationen für ihren prophylaktischen und therapeutischen Einsatz. *Med Klinik*, 90(9):520–526.
- Cascorbi I, Forêt M. 1991. Interaction of xenobiotics on the glucose-transport system and the Na⁺/K⁺-ATPase of human skin fibroblasts. *Ecotoxicol Environ Saf*, 21(1):38–46.
- Choi HS, Ipe BI, Misra P, Lee JH, Bawendi MG, Frangioni JV. 2009. Tissue- and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots. *Nano Lett*, 9(6):2354–2359.
- Coligan JE, Schnute WC, Egan ML, Todd CW. 1975. The chemistry of carcinoembryonic antigen. *Cancer*, 36(6 Suppl):2455–2459.
- Covell DG, Barbet J, Holton OD, Black CD, Parker RJ, Weinstein JN. 1986. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')₂, and Fab' in mice. *Cancer Res*, 46(8):3969–3978.
- Danila D, Partha R, Elrod DB, Lackey M, Casscells SW, Conyers JL. 2009. Antibody-labeled liposomes for CT imaging of atherosclerotic plaques: in vitro investigation of an anti-ICAM antibody-labeled liposome containing iohexol for molecular imaging of atherosclerotic plaques via computed tomography. *Tex Heart Inst J*, 36(5):393–403.
- Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, Uggeri F, Paoletti S, Colombatti A. 2009. A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology*, 19(10):1056–1067.
- Deissler V, Rüger R, Frank W, Fahr A, Kaiser WA, Hilger I. 2008. Fluorescent liposomes as contrast agents for in vivo optical imaging of edemas in mice. *Small*, 4(8):1240–1246.
- Dissanayake S, Hay FC. 1975. Pepsin digestion of mouse IgG immunoglobulins subfragments of the Fc region. *Immunochemistry*, 12(5):373–378.
- Dyomics. GmbH 2007. Product catalogue, 5th edition, einsehbar unter <http://www.dyomics.com/downloads.html>, erstellt Herbst 2007, eingesehen am 27.10.2009.
- Fernandez-Patron C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos L. 1995. Double staining of coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins. *Anal Biochem*, 224(1):263–269.
- Funovics MA, Alencar H, Su HS, Khazaie K, Weissleder R, Mahmood U. 2003. Miniaturized multichannel near infrared endoscope for mouse imaging. *Mol Imaging*, 2(4):350–357.
- Funovics MA, Weissleder R, Mahmood U. 2004. Catheter-based in vivo imaging of enzyme activity and gene expression: feasibility study in mice. *Radiology*, 231(3):659–666.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5):1417–1423.

- Gold P, Freedman SO. 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, 122(3):467–481.
- Grimm J, Wunder A. 2005. Molekulare Bildgebung: Stand der Forschung. *Röfo*, 177(3):326–337.
- Grothendieck G. 2008. lattice: Multivariate Data Visualization with R. *Journal of Statistical Software, Book Reviews*, 25(2):1–3.
- Gruber HJ, Hahn CD, Kada G, Riener CK, Harms GS, Ahrer W, Dax TG, Knaus HG. 2000. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconjug Chem*, 11(5):696–704.
- Gudihal R, Ragalopalan S, Gulge R, Gieschen A, Miller C, Tang N, Waddell K. 2008. Primary Characterization of a Monoclonal Antibody Using Agilent HPLC-Chip Accurate-Mass LC/MS Technology, Website der Firma Agilent Technologies, Inc., einsehbar unter http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-3445en_lo%20CMS.pdf, eingesehen am 09.07.2010.
- Gupta N, Price PM, Aboagye EO. 2002. PET for in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements. *Eur J Cancer*, 38(16):2094–2107.
- Halliday D, Resnick R, Walker J. 2003. Physik. 6te Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.
- Hamann FM, Brehm R, Pauli J, Grabolle M, Frank W, Kaiser WA, Fischer D, Resch-Genger U, Hilger I. 2010. Controlled modulation of serum protein binding and biodistribution of asymmetric cyanine dyes by variation of the number of sulfonate groups. *Molecular Imaging*: in Press.
- Hansch A, Frey O, Hilger I, Sauner D, Haas M, Schmidt D, Kurrat C, Gajda M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA. 10/2004. Diagnosis of arthritis using near-infrared fluorochrome Cy5.5. *Invest Radiol*, 39(10):626–632.
- Hansch A, Frey O, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA. 3/2004. In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence. *Arthritis Rheum*, 50(3):961–967.
- Hayashi K, Hasegawa Y, Tokoro T. 1986. Indocyanine green angiography of central serous chorioretinopathy. *Int Ophthalmol*, 9(1):37–41.
- Hecht E. 2001. Optik. Dritte Aufl. Oldenburg Wissenschaftsverlag GmbH.
- Hilger I, Leistner Y, Berndt A, Fritsche C, Haas KM, Kosmehl H, Kaiser WA. 2004. Near-infrared fluorescence imaging of HER-2 protein over-expression in tumour cells. *Eur Radiol*, 14(6):1124–1129.
- Hnatowich DJ. 2002. Observations on the role of nuclear medicine in molecular imaging. *J Cell Biochem Suppl*, 39:18–24.
- Holliger P, Hudson PJ. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 23(9):1126–1136.

- Holm E. 2007. Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten: Analysen und Empfehlungen. Erste Aufl. Georg Thieme Verlag GmbH.
- Hope-Ross M, Yannuzzi LA, Gragoudas ES, Guyer DR, Slakter JS, Sorenson JA, Krupsky S, Orlock DA, Puliafito CA. 1994. Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology*, 101(3):529–533.
- Jain M, Batra SK. 2003. Genetically engineered antibody fragments and PET imaging: a new era of radioimmunodiagnosis. *J Nucl Med*, 44(12):1970–1972.
- Jünger M, Steins A, Schlagenhauß B, Rassner G. 1999. Die Mikrozirkulation des kutanen Melanoms. *Hautarzt*, 50(12):848–852.
- Kapuscinski J, Yanagi K. 1979. Selective staining by 4', 6-diamidine-2-phenylindole of nanogram quantities of DNA in the presence of RNA on gels. *Nucleic Acids Res*, 6(11):3535–3542.
- Ke S, Wen X, Gurfinkel M, Charnsangavej C, Wallace S, Sevik-Muraca EM, Li C. 2003. Near-infrared optical imaging of epidermal growth factor receptor in breast cancer xenografts. *Cancer Res*, 63(22):7870–7875.
- Kim EE. 2003. Targeted molecular imaging. *Korean J Radiol*, 4(4):201–210.
- Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW. 1999. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15):8461–8466.
- Kossodo S, Pickarski M, Lin SA, Gleason A, Gaspar R, Buono C, Ho G, Blusztajn A, Cuneo G, Zhang J, Jensen J, Hargreaves R, Coleman P, Hartman G, Rajopadhye M, Duong L, Sur C, Yared W, Peterson J, Bednar B. 2009. Dual In Vivo Quantification of Integrin-targeted and Protease-activated Agents in Cancer Using Fluorescence Molecular Tomography (FMT). *Mol Imaging Biol*.
- König K. 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*, 200(Pt 2):83–104.
- Laabs E, Béhé M, Kossatz S, Frank W, Kaiser WA, Hilger I. 2010. Optical Imaging of CCK2/Gastrin Receptor-Positive Tumors With a Minigastrin Near-Infrared Probe. *Invest Radiol*.
- Lee SI, Lee SY, Yoon KH, Choi KS, Jang KY, Yoo WH, Kim SH, Choi TH, Park JG. 2009. Molecular MR imaging for visualizing ICAM-1 expression in the inflamed synovium of collagen-induced arthritic mice. *Korean J Radiol*, 10(5):472–480.
- van de Lest CH, Versteeg EM, Veerkamp JH, Kuppevelt THV. 1995. Elimination of autofluorescence in immunofluorescence microscopy with digital image processing. *J Histochem Cytochem*, 43(7):727–730.
- Lipson SG, Lipson HS, Tannhauser DS. 1997. *Optik*. Dritte Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Liu N, Li M, Li X, Meng X, Yang G, Zhao S, Yang Y, Ma L, Fu Z, Yu J. 2/2009. PET-based biodistribution and radiation dosimetry of epidermal growth factor receptor-selective tracer ¹¹C-PD153035 in humans. *J Nucl Med*, 50(2):303–308.

- Liu S, Jia B, Qiao R, Yang Z, Yu Z, Liu Z, Liu K, Shi J, Ouyang H, Wang F, Gao M. 6/2009. A novel type of dual-modality molecular probe for MR and nuclear imaging of tumor: preparation, characterization and in vivo application. *Mol Pharm*, 6(4):1074–1082.
- Lottspeich F, Engels JW, Hrsg. 2006. *Bioanalytik*. Zweite Aufl. Spektrum Akademischer Verlag.
- Lu Y, Harding SE, Turner A, Smith B, Athwal DS, Grossmann JG, Davis KG, Rowe AJ. 2008. Effect of PEGylation on the solution conformation of antibody fragments. *J Pharm Sci*, 97(6):2062–2079.
- Lövqvist A, Humm JL, Sheikh A, Finn RD, Kozirowski J, Ruan S, Pentlow KS, Jungbluth A, Welt S, Lee FT, Brechbiel MW, Larson SM. 2001. PET imaging of (86)Y-labeled anti-Lewis Y monoclonal antibodies in a nude mouse model: comparison between (86)Y and (111)In radiolabels. *J Nucl Med*, 42(8):1281–1287.
- Mage MG. 1980. Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. *Methods Enzymol*, 70(A):142–150.
- Massoud TF, Gambhir SS. 2003. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, 17(5):545–580.
- Mishra A, Behera RK, Behera PK, Mishra BK, Behera GB. 2000. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem Rev*, 100(6):1973–2012.
- Moesta KT, Ebert B, Handke T, Nolte D, Nowak C, Haensch WE, Pandey RK, Dougherty TJ, Rinneberg H, Schlag PM. 2001. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases. *Cancer Res*, 61(3):991–999.
- Mohsin H, Jia F, Sivaguru G, Hudson MJ, Shelton TD, Hoffman TJ, Cutler CS, Ketring AR, Athey PS, Simón J, Frank RK, Jurisson SS, Lewis MR. 2006. Radiolanthanide-labeled monoclonal antibody CC49 for radioimmunotherapy of cancer: biological comparison of DOTA conjugates and 149Pm, 166Ho, and 177Lu. *Bioconjug Chem*, 17(2):485–492.
- Mujumdar SR, Mujumdar RB, Grant CM, Waggoner AS. 1996. Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem*, 7(3):356–362.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. 2008. *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9te Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Mönnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Mönnikes I. 2001. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis*, 19(3):201–211.
- Nakayama A, del Monte F, Hajjar RJ, Frangioni JV. 2002. Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy. *Mol Imaging*, 1(4):365–377.
- Nelson AL, Reichert JM. 2009. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol*, 27(4):331–337.
- Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R. 2003. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol*, 13(1):195–208.

- Ntziachristos V, Chance B. 2001. Probing physiology and molecular function using optical imaging: applications to breast cancer. *Breast Cancer Res*, 3(1):41–46.
- Ntziachristos V, Ripoll J, Weissleder R. 2002a. Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies? *Opt Lett*, 27(5):333–335.
- Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R. 2002b. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nat Med*, 8(7):757–760.
- Pauli J, Brehm R, Spieles M, Kaiser WA, Hilger I, Resch-Genger U. 2010. Novel fluorophores as building blocks for optical probes for in vivo near infrared fluorescence (NIRF) imaging. *J Fluoresc*, 20(3):681–693.
- Pauli J, Vag T, Haag R, Spieles M, Wenzel M, Kaiser WA, Resch-Genger U, Hilger I. 2009. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging. *Eur J Med Chem*, 44(9):3496–3503.
- Pierce. 1/2005. ImmunoPure® F(ab')₂ Preparation Kit. Manual.
- Pierce. 5/2005. ImmunoPure® Fab Preparation Kit. Manual.
- Pingoud A, Urbanke C, Hogget J, Jeltsch A. 2002. *Biochemical Methods. A Concise Guide for Students and Researchers*. Erste Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.
- Ramakrishnan M, Wengenack TM, Kandimalla KK, Curran GL, Gilles EJ, Ramirez-Alvarado M, Lin J, Garwood M, Jack CR, Poduslo JF. 2008. Selective contrast enhancement of individual Alzheimer's disease amyloid plaques using a polyamine and Gd-DOTA conjugated antibody fragment against fibrillar Aβ₄₂ for magnetic resonance molecular imaging. *Pharm Res*, 25(8):1861–1872.
- Randolph JB, Waggoner AS. 1997. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res*, 25(14):2923–2929.
- Reilly RM, Sandhu J, Alvarez-Diez TM, Gallinger S, Kirsh J, Stern H. 1995. Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet*, 28(2):126–142.
- Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM. 1982. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J Immunol*, 128(5):2300–2305.
- Richter G, Hrsg. 2003. *Praktische Biochemie*. Erste Aufl. Georg Thieme Verlag.
- Rousseaux J, Rousseaux-Prévost R, Bazin H. 1983. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Methods*, 64(1-2):141–146.
- Schad H, Brechtelsbauer H, Kramer K. 1977. Studies on the suitability of a cyanine dye (Viher-Test) for indicator dilution technique and its application to the measurement of pulmonary artery and aortic flow. *Pflugers Arch*, 370(2):139–144.

- Sernetz M, Giese C, Hauptmann U, Hild D, Müller M. 2000. Spezielle Methoden der Lichtmikroskopie: Fluoreszenzmikroskopie, Mikroskopfluorometrie, Website einsehbar unter <http://www.uni-giessen.de/~ji38/publica/mikros/kapitel7.html>, eingesehen am 11.07.2010.
- Serpone N, Sahyun MRVJ. 1994. Photophysics of dithiacarbocyanine dyes: subnanosecond relaxation dynamics of a dithia-2,2'-carbocyanine dye and its 9-methyl-substituted meso analog. *Phys Chem*, 98:734.
- Shapiro A, Vinuela E, Maizel J. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28:815–820.
- Siemens. AG 2007. Website einsehbar unter <http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/PSGen%20ericDisplay?storeId=10001&langId=3&catalog3&catTree=100001%20,1004808&pageId=320%2078>, erstellt 2007, eingesehen am 14.01.2007.
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD. 1976. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*, 12(3):180–191.
- Tung CH, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R. 1999. Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjug Chem*, 10(5):892–896.
- UniProt-Consortium. 2009. UniProt Database, Website einsehbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769>, zuletzt aktualisiert am 01.09.2009. Eingesehen am 26.10.2.
- Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, Ward ES. 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol*, 23(10):1283–1288.
- Wagnières GA, Star WM, Wilson BC. 1998. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol*, 68(5):603–632.
- Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. 2008. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 84(5):548–558.
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B. 2010. Package 'gplots', Manual einsehbar unter <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf>, eingesehen am 09.07.10.
- Weissleder R. 2001. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*, 19(4):316–317.
- Weissleder R, Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology*, 219(2):316–333.
- Weissleder R, Ntziachristos V. 2003. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med*, 9(1):123–128.
- Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A. 1999. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol*, 17(4):375–378.
- Weiβ. 2010. Fluoreszenz, Website einsehbar unter <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/fluoreszenz.htm>, eingesehen am 26.05.2010.

- WHO. 2009. Website der World Health Organisation zum Thema Krebs, einsehbar unter <http://www.who.int/cancer/en/>, eingesehen am 04.12.2009.
- Willert A. 1995. Spektroskopische Untersuchungen am ionenspezifischen Farbstoff Fura-2 zum Nachweis von Manganionen, einsehbar unter <http://www-user.tu-chemnitz.de/~awill/diplom/Titel.html>, erstellt 1997, eingesehen am 22.02.2009.
- Zou P, Xu S, Povoski SP, Wang A, Johnson MA, Martin EW, Subramaniam V, Xu R, Sun D. 2009. Near-infrared fluorescence labeled anti-TAG-72 monoclonal antibodies for tumor imaging in colorectal cancer xenograft mice. *Mol Pharm*, 6(2):428–440.

Anhang

Tabelle 37: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten der Mausgewebe Muskel, LS174T- und A375-Tumor zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Messregionen)	p-Wert
0	Muskel - LS174T-Tumor	1,000
	Muskel - A375-Tumor	1,000
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	1,000
2	Muskel - LS174T-Tumor	0,037
	Muskel - A375-Tumor	0,075
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	1,000
4	Muskel - LS174T-Tumor	0,053
	Muskel - A375-Tumor	0,022
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	1,000
8	Muskel - LS174T-Tumor	0,066
	Muskel - A375-Tumor	0,030
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	1,000
16	Muskel - LS174T-Tumor	0,555
	Muskel - A375-Tumor	0,072
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	0,816
24	Muskel - LS174T-Tumor	0,051
	Muskel - A375-Tumor	0,020
	LS174T-Tumor - A375-Tumor	1,000

Tabelle 38: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs (Bonferroni-Test) zwischen den Mittelwerten der Relativen Fluoreszenzintensitäten der Mausgewebe Muskel, LS174T- und A375-Tumor zu den verschiedenen Zeitpunkten nach F(ab')-Dy-Injektion und dem jeweiligen Nativwert (pre, d. h. vor Sondeninjektion). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Messregion	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
Muskel	pre - 0 h (sofort)	1,000
	pre - 2	0,014
	pre - 4	< 0,001
	pre - 8	< 0,001
	pre - 16	< 0,001
	pre - 24	0,006
A375-Tumor	pre - 0 h (sofort)	1,000
	pre - 2	0,066
	pre - 4	< 0,001
	pre - 8	< 0,001
	pre - 16	< 0,001
	pre - 24	0,001
LS174T-Tumor	pre - 0 (sofort)	1,000
	pre - 2	0,010
	pre - 4	< 0,001

Tabelle 38: Fortsetzung

Messregion	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
	pre - 8	< 0,001
	pre - 16	< 0,001
	pre - 24	0,001

Tabelle 39: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen dem Mittelwert des normierten Nativ-/Autofluoreszenzwertes (Zeitpunkt pre) des Blutes und den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Plasmaproben (nach IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy-Injektion) zu den Blutentnahme-Zeitpunkten 5, 15 und 30 min sowie 1, 4, 24 und 48 h (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Sonde	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte)	p-Wert
IgG-Dy	pre - 5 min	0,123
	pre - 15 min	0,100
	pre - 30 min	0,005
	pre - 1 h	0,001
	pre - 4 h	< 0,001
	pre - 24 h	0,061
	pre - 48 h	0,329
F(ab') ₂ -Dy	pre - 5 min	< 0,001
	pre - 15 min	< 0,001
	pre - 30 min	< 0,001
	pre - 1 h	< 0,001
	pre - 4 h	< 0,001
	pre - 24 h	0,066
	pre - 48 h	0,339
F(ab')-Dy	pre - 5 min	< 0,001
	pre - 15 min	< 0,001
	pre - 30 min	< 0,001
	pre - 1 h	< 0,001
	pre - 4 h	0,009
	pre - 24 h	1,000
	pre - 48 h	1,000

Tabelle 40: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den Mittelwerten der normierten Relativen Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Plasmaproben (nach IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy-Injektion) zu den verschiedenen Blutentnahme-Zeitpunkten (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
5 min	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,004
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
15 min	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	1,000
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,001

Tabelle 40: Fortsetzung

Zeitpunkt	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
30 min	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	1,000
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
1 h	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,039
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
4 h	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,369
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,001
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,007
24 h	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,322
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
48 h	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,615
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001

Tabelle 41: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe mit dem Referenzgewebe Muskel zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach IgG-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Organe)	p-Wert
1	Muskel - Leber	0,217
	Muskel - Niere	1,000
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	0,006
	Muskel - Dickdarm	0,069
6	Muskel - Leber	< 0,001
	Muskel - Niere	< 0,001
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	0,125
	Muskel - Milz	0,060
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	< 0,001
	Muskel - Dickdarm	< 0,001
24	Muskel - Leber	0,197
	Muskel - Niere	1,000
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	1,000
	Muskel - Dickdarm	0,807

Tabelle 42: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen dem mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert (Zeitpunkt pre) und den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach IgG-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Organ	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
Leber	pre - 1	0,022
	pre - 6	0,002
	pre - 24	0,108
Niere	pre - 1	< 0,001
	pre - 6	< 0,001
	pre - 24	0,488
Muskel	pre - 1	0,320
	pre - 6	0,020
	pre - 24	1,000
Herz	pre - 1	0,004
	pre - 6	0,020
	pre - 24	1,000
Lunge	pre - 1	0,001
	pre - 6	< 0,001
	pre - 24	1,000
Milz	pre - 1	0,002
	pre - 6	0,018
	pre - 24	0,347
Magen	pre - 1	1,000
	pre - 6	1,000
	pre - 24	0,365
Dünndarm	pre - 1	0,001
	pre - 6	0,197
	pre - 24	1,000
Dickdarm	pre - 1	0,218
	pre - 6	0,011
	pre - 24	1,000

Tabelle 43: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe mit dem Referenzgewebe Muskel zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach F(ab')₂-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Organe)	p-Wert
1	Muskel - Leber	< 0,001
	Muskel - Niere	< 0,001
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	0,196
	Muskel - Dickdarm	< 0,001
6	Muskel - Leber	0,053

	Muskel - Niere	0,094
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	0,061
	Muskel - Dickdarm	1,000
24	Muskel - Leber	< 0,001
	Muskel - Niere	0,040
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	1,000
	Muskel - Dickdarm	0,090

Tabelle 44: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen dem mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert (Zeitpunkt pre) und den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach F(ab')₂-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Organ	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
Leber	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,002
	0 - 24	0,002
Niere	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,049
	0 - 24	0,295
Muskel	0 - 1	0,003
	0 - 6	1,000
	0 - 24	1,000
Herz	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,023
	0 - 24	0,307
Lunge	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,014
	0 - 24	0,032
Milz	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,076
	0 - 24	0,057
Magen	0 - 1	0,288
	0 - 6	0,179
	0 - 24	0,087
Dünndarm	0 - 1	0,286
	0 - 6	0,236
	0 - 24	1,000
Dickdarm	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	0,788
	0 - 24	0,591

Tabelle 45: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe mit dem Referenzgewebe Muskel zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach F(ab')-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Organe)	p-Wert
1	Muskel - Leber	< 0,001
	Muskel - Niere	1,000
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	0,129
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	1,000
	Muskel - Dickdarm	0,001
6	Muskel - Leber	0,064
	Muskel - Niere	1,000
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	1,000
	Muskel - Dickdarm	0,105
24	Muskel - Leber	0,010
	Muskel - Niere	1,000
	Muskel - Herz	1,000
	Muskel - Lunge	1,000
	Muskel - Milz	1,000
	Muskel - Magen	1,000
	Muskel - Dünndarm	1,000
	Muskel - Dickdarm	1,000

Tabelle 46: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen dem mittleren Nativ-/Autofluoreszenzwert (Zeitpunkt pre) und den mittleren RFI-Werten sämtlicher Organe zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach F(ab')-Dy-Injektion (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Organ	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
Leber	0 - 1	0,005
	0 - 6	< 0,001
	0 - 24	0,046
Niere	0 - 1	< 0,001
	0 - 6	< 0,001
	0 - 24	0,150
Muskel	0 - 1	1,000
	0 - 6	1,000
	0 - 24	1,000
Herz	0 - 1	0,042
	0 - 6	0,097
	0 - 24	1,000
Lunge	0 - 1	0,003

Tabelle 46: Fortsetzung

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Zeitpunkte [h])	p-Wert
Milz	0 - 6	< 0,001
	0 - 24	0,445
	0 - 1	0,004
Magen	0 - 6	0,242
	0 - 24	0,694
	0 - 1	0,908
Dünndarm	0 - 6	1,000
	0 - 24	0,217
	0 - 1	0,167
Dickdarm	0 - 6	0,031
	0 - 24	1,000
	0 - 1	1,000
	0 - 6	0,343
	0 - 24	1,000

Tabelle 47: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Leber zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,009
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,001
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,054
6	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	1,000
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,005
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,009
24	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,508
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,650
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000

Tabelle 48: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Niere zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')$ -Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,346
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,001
6	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,002
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,269
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,011

Tabelle 48: Fortsetzung

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
24	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,102
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	< 0,001

Tabelle 49: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Muskel zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	< 0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	< 0,001
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	1,000
6	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,214
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,288
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	1,000
24	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,009
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,017
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	1,000

Tabelle 50: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Herz zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,015
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,003
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,519
6	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,133
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,203
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	1,000
24	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,001
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,002
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,305

Tabelle 51: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Lunge zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000

Tabelle 51: Fortsetzung

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
6	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,016
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,048
	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,054
24	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,269
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,822
	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000
24	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,163
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,609
	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000

Tabelle 52: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm}-Werten des Organs Milz zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,035
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,017
6	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,421
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,209
24	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,769
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,024
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,118

Tabelle 53: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm}-Werten des Organs Magen zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, F(ab')₂- oder F(ab')-Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,016
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,048
6	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	0,054
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,269
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,822
24	IgG-Dy - F(ab') ₂ -Dy	1,000
	IgG-Dy - F(ab')-Dy	0,163
	F(ab') ₂ -Dy - F(ab')-Dy	0,609

Tabelle 54: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Dünndarm zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')_2$ -Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	1,000
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,547
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000
6	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,460
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,770
24	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,018
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,019
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000

Tabelle 55: Ergebnisse des statistischen Einzelwertvergleichs zwischen den mittleren RFI_{norm} -Werten des Organs Dickdarm zu den Zeitpunkten 1, 6 und 24 h nach Injektion einer der drei fluorooptischen Sonden IgG-, $F(ab')_2$ - oder $F(ab')_2$ -Dy (Bonferroni-Test). Angegeben ist die statistische Signifikanz (p-Wert) des jeweiligen paarweisen Vergleichs.

Zeitpunkt [h]	Vergleichsgruppen (Sonden)	p-Wert
1	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	0,016
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	0,378
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,138
6	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	1,000
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	0,798
24	IgG-Dy - $F(ab')_2$ -Dy	1,000
	IgG-Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000
	$F(ab')_2$ -Dy - $F(ab')$ -Dy	1,000

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt besonders:

- dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung Jena, das mir ein halbjähriges Stipendium für meine Forschungen gewährte
- Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger für die Bereitstellung des Themas, die zuverlässige, konstruktive und fachkompetente Betreuung sowie die unzähligen wertvollen Denkanstöße
- Dr. rer. nat. Marcus R. Lisy für seine Betreuung
- Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die Einführung in die Arbeitstechniken der Zellkultur und die hilfsbereite Unterstützung
- Herrn Dr. rer. pol. Thomas Lehmann für die geduldige und freundliche Hilfestellung in Bezug auf statistische Fragestellungen
- Frau Annika Görmer, ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena, für die Bereitstellung der Daten zum Carcinoembryonalen Antigen
- Frau Dr. Jutta Pauli für die gute Kooperation bezüglich der Quantenausbeute-Analyse
- Fa. DYOMICS Jena, für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung des Fluorochromes DY-676
- Prof. Dr. med. A. Habenicht (Institut für Vaskuläre Medizin) für die Bereitstellung des CLSM
- Dr. Harald Schubert und Mitarbeiter (Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena) für die gute Zusammenarbeit
- meiner Mutter Karin Thomas für die hervorragende seelische und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung
- M. Sc. Nancy Richter, Dipl.-Bioinf. Sebastian Vlaic und Dipl.-Phys. Ronald Läscher für die vielen denkanstoßenden und produktiven Diskussionen sowie sinnvollen Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit

Tabellarischer Lebenslauf

Claudia Thomas

*07. Juni 1983 in Jena
Oberaue 2
07745 Jena

Tel.: 03641/5419495
Mobil: 0176/22382170
E-Mail: Claudia.Thomas@med.uni-jena.de

Familienstand

ledig, keine Kinder

Berufserfahrung

seit 8/2010

Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie Universitätsklinikum Jena

Wissenschaftliche Publikationen

2008

Lisy MR, Goermar A, Thomas C, Pauli J, Resch-Genger U, Kaiser WA, Hilger I. 2008. In vivo near-infrared fluorescence imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in mice. Radiology, 247(3):779–787.

Studium

10/2002 - 05/2010

Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

08 - 09/2004

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)

03/2006 – 03/2007

Experimentelle Untersuchungen in der AG Experimentelle Radiologie zur Promotionsarbeit mit dem Thema: „Studien zur Pharmakokinetik fluorooptischer Sonden mit unterschiedlichem Molekulargewicht“

08/2008 – 07/2009

Praktisches Jahr

04 – 05/2010

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Einsatzorte während des Praktischen Jahres

05 – 07/2009

Kinderherz- und Gefäßchirurgie Universitätsklinikum Ramathibodi Bangkok, Thailand

03 – 05/2009

Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie Plastische Chirurgie Universitätsklinikum Jena

12/2008 - 03/2009	Innere Medizin/Hämatologie und Onkologie Universitätsklinikum Jena
08 – 12/2008	Neurologie Sofien- und Hufeland-Klinikum Weimar

Praktika während des Studiums

08 – 09/2007	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe Universitätsklinikum Cayetano Heredia Lima, Peru
02 – 04/2007	Famulatur Innere Medizin/Onkologie Universitätsklinikum Jena
09 – 10/2005	Famulatur Anästhesie (Notaufnahme und Intensivstation) Charité Berlin Mitte
03/2004 – 04/2004	Pflegepraktikum Neurochirurgie und Viszeralchirurgie Universitätsklinikum Jena
09/2003	Pflegepraktikum auf der Neurologischen Intensivstation Stufe B in der Moritzklinik Bad Klosterlausnitz

Weitere medizinisch-praktische Erfahrungen

09/2005 - 01/2010	Arbeit als studentische Hilfskraft im neurologischen Schlaflabor Erfurt
-------------------	---

Schulbildung

1994 – 2002	Friedrich-Schiller-Gymnasium Eisenberg mit Abitur Thema der Seminarfacharbeit im Abitur: „Natur pur – Die andere Art der Heilung!?“
1990 – 1994	Grundschule Martin-Luther Eisenberg

Jena, den 17. Januar 2012

Claudia Thomas

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger Ingrid Hilger (Arbeitsgruppenleiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena)

Dr. rer. nat. Marcus R. Lisy (ehemaliger wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Jena)

Dr. rer. pol. Thomas Lehmann (wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation Jena)

Dipl.-Bioinf. Sebastian Vlaic (wissenschaftlicher Mitarbeiter des Hans-Knöll-Instituts (HKI) Jena, zugehörig dem Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology e.V.)

- die zur Auswertung der Versuche zum Carcinoembryonalen Antigen herangezogenen Daten teilweise von Frau Annika Görmer (ehemalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Jena) generiert wurden (siehe Verweise im Text),
- die Daten zur Quantenausbeute des F(ab')- und Anti-CEA-F(ab')-Dy in Kooperation mit Frau Dr. Jutta Pauli (wissenschaftliche Mitarbeiterin des Bundesamtes für Materialforschung und -prüfung) generiert wurden,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 17. Januar 2012

Claudia Thomas, Verfasserin